



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Rita Araújo Franco

ESTUDO DO TEMPO DE VIDA ÚTIL DE AZEITONAS
GALEGAS EMBALADAS EM DUAS ATMOSFERAS
DIFERENTES

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em
Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Orientadora

Professora Doutora Joana Santos Guerreiro

Coorientador

Professor Mestre Mário Barros

Maio, 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à Doutora Joana Santos Guerreiro, minha orientadora nesta dissertação. Obrigado por me prestar um acompanhamento excecional, por me incentivar ao longo destes seis meses e principalmente por ter acreditado em mim. Também agradeço a ajuda incondicional nas partes teórico-prática.

Ao meu coorientador Mestre Mário Barros, agradeço por todos os esclarecimentos prestados no decorrer da dissertação, a partilha de conhecimentos e o apoio na parte prática. A sua orientação e rigor científico foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Engenheira Carla Ramos agradeço a ajuda oferecida na compilação dos dados em ficheiro Excel.

À Doutora Élia, Doutora Preciosa e Doutor Paulo Fernandes quero agradecer pelo facto de aceitarem este projeto, juntamente com a Doutora Joana Santos, e analisarem as características físico-químicas e microbiológicas das azeitonas fornecidas pela empresa Probeira (que também agradeço a disponibilidade).

Kevin, para ti tenho um agradecimento muito especial, por seres um pilar fundamental na minha vida, por me compreenderes, ajudares, motivares em todos os momentos e por sempre acreditares em mim. E, claro, não posso deixar de agradecer aos teus pais e irmãos, sobretudo à tua mãe Lucinda.

Por fim, mas nunca em último, agradeço à minha enorme família. Aos meus pais, pela educação e amor que me dão. A todos os meus irmãos, Sara, Samuel, Isabel, Catarina, Olavo, Elisabete, Luís, Filipe e Teresa que, de certa forma e à maneira deles, me ajudaram a chegar até aqui.

Às minhas queridas avós, que estarão sempre a olhar por mim...

RESUMO

As azeitonas são frutos provenientes de oliveiras, espécie denominada por *Olea europaea* L., e apenas podem ser ingeridas, após tratamentos específicos, sob a forma de azeite ou como azeitonas de mesa. São diversas as variedades existentes no mercado de azeitonas de mesa, as pretas de variedade Galega são tradicionalmente produzidas em Castelo Branco, na Região Natural da Beira Baixa, em Portugal. Nesta dissertação, foi realizado um estudo do binómio tipo de atmosfera/temperatura ao longo do tempo, com o objetivo de aumentar o tempo de vida útil deste produto. Desta forma, foram fornecidas, por uma empresa privada, 78 amostras dessas mesmas azeitonas, sendo que, 39 foram embaladas, em embalagens com atmosfera modificada (MAP), com uma composição de 20% de dióxido de carbono (CO₂) e 80% de árgon (Ar), e as outras 39 em embalagens com atmosfera normal (ar), todas elas sem salmoura. As amostras foram incubadas sob três diferentes temperaturas de armazenamento, (5 ± 3 °C, 22 ± 2 °C e 44 ± 0.5 °C) sendo analisadas em cinco períodos diferentes (0, 30, 75, 123 e 207 dias) quanto às características microbiológicas (agentes patogénicos, indicadores de contaminação, bolores, leveduras, microrganismos totais a 30 °C (TVC), bactérias lácticas (LAB) e fungos) e químicas (acidez, cloretos, gordura, humidade e azoto). Até ao final do período de análises, os agentes patogénicos não foram detetados (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase-positiva) nem os microrganismos indicadores de contaminação (*Escherichia coli* e esporos de Clostrídios sulfito-redutores). O desenvolvimento da flora microbiana é efetivamente restrito quando as amostras foram armazenadas a temperaturas de 44 °C, em ambas as atmosferas, durante o seu tempo de vida útil. A 22 °C e a 5 °C, nas duas atmosferas estudadas, verificaram-se semelhanças nos valores obtidos para microrganismos a 30 °C e bactérias lácticas, não sendo estas inibidas pela presença de CO₂ na MAP, que variaram entre 4 log cfu/g e 7 log cfu/g. A contagem de bolores e leveduras foi maior nas embalagens com atmosfera normal do que nas MAP. Também se verificou que a taxa de crescimento dos TVC foi mais lenta em amostras embaladas em MAP a 5 °C do que a 22 °C. Por esta razão, é possível afirmar que a utilização de atmosfera modificada torna-se vantajosa para evitar o crescimento de bolores, leveduras e TVC quando as amostras estão armazenadas a temperaturas de 5 °C. Quanto às características morfológicas,

confirmou-se que o grupo de LAB foi o mais predominante na identificação de bactérias, sendo *Leuconostoc* spp. e *Pediococcus* spp. as espécies mais encontradas. Já as leveduras fizeram parte de 90% dos fungos identificados, sendo maioritariamente *Candida* spp e *Saccharomyces* spp., enquanto que os bolores representaram os restantes 10% tendo principalmente *Penicillium* spp. e *Cryptococcus* spp.

Ao longo do tempo de armazenamento, os diferentes tratamentos de embalagem não tiveram qualquer efeito nos parâmetros químicos analisados, com a exceção dos componentes gordura e humidade quando armazenados a 44 °C. Às temperaturas de 22 °C e 5 °C, os parâmetros mantiveram valores que variaram entre 2.84% e 3.25% no caso dos cloretos, 22.1% e 26.1% em relação à gordura, 62.4% e 65.6% quanto à humidade e 0.20% e 0.23% no caso do azoto. Os valores de acidez, contrariamente aos outros parâmetros químicos, foram os mais discrepantes ao longo do tempo entre as várias temperaturas de armazenamento, apesar de serem semelhantes no que diz respeito ao tipo de embalagem.

No final do estudo, as amostras das azeitonas de mesa em estudo não satisfaziam os requisitos do consumidor devido ao seu aspeto em termos visuais, mas de acordo com os parâmetros químicos e microbiológicos avaliados, verificou-se que as mesmas encontravam-se aceitáveis para consumo.

Palavras-Chave: azeitonas de mesa pretas de variedade Galega; caracterização microbiológica e química, MAP, tempo de vida útil.

ABSTRACT

The olives are the fruits from olive trees, specie denominated by *Olea europaea* L., and are only eaten after specific treatments, in the form of oil or as table olives. There are several existing varieties in the market of table olives. Black table olives of Galega variety are traditionally produced in “Castelo Branco”, natural region of Beira Baixa, in Portugal. In this dissertation, a study of the binomial type of atmosphere/temperature along the time was performed, with the purpose to increase the shelf life of this product. In the study 78 samples of those olives were supplied by a private company, then 39 were packed using modified atmosphere packaging (MAP), composed by 20% CO₂ and 80% Ar, and the other 39 were packed under air, all of them without acidified brine. The samples were placed at three different temperatures (5 ± 3 °C, 22 ± 2 °C and 44 ± 0.5 °C) and analysed at five different periods (0, 30, 75, 123 e 207 days) for their microbiological parameters (pathogenic bacteria, microbial indicators of contamination, moulds, yeasts, total viable counts (TVC), lactic acid bacteria (LAB) and fungi) and chemical parameters (acidity, chlorides, fat, moisture and N-Kjeldahl). Until the end of storage, the pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and coagulase-positive staphylococci) and microbial indicators of contamination (*Escherichia coli* and sulphite-reducing clostridia spores) were undetected. During the shelf life of the olives, the storage at 44 °C in both atmospheres effectively restricted the development of the microbial flora. At 22 °C and 5 °C, in both atmospheres, the values reported for TVC are similar to the values obtained for LAB, that are not inhibited by the presence of CO₂ present in MAP, ranging around 4 log cfu/g and 7 log cfu/g. The samples stored under air showed a higher count of moulds and yeasts than in MAP. Also, in the samples stored under MAP at 5 °C, the TVC growth rates was slower than at 22 °C. From this, it is possible to say that the use of MAP is advantageous to avoid mould growth and enabling also a lower growth of yeasts and TVC at the storage temperature of 5 °C. Based on morphological characteristics, the predominant bacteria identified belong to the LAB group, where the main genus were *Leuconostoc* spp. and *Pediococcus* spp.. The predominant fungi identified were yeasts with an approximate value of 90%, and their genus were mostly *Candida* spp. and *Saccharomyces* spp.. The moulds presented only 10% of the total

fungi identification and the genus *Penicillium* spp. and *Cryptococcus* spp. were the most frequent.

Along the storage time, the different packing treatments had no effect on the particular chemical parameters measured, with the exception of fat and moisture contents when stored at 44 °C. At 22 °C and 5 °C, the values of the components varied between 2.84% and 3.25% in the case of chlorides, 22.1% and 26.1% in relation to fat, 62.4% and 65.6% for moisture and 0.20% e 0.23% in the case of chlorides. The value reported for acidity, unlike of the other components, were the most disparate over time among the various storage temperatures, although there were similarities with regard to the type of packaging.

When study ends, the samples of ‘Galega’ black table olives didn’t complied the requirements of the consumer, because their aspect in visual terms, but in accordance with the microbiological and chemical parameters evaluated, they were acceptable to consume.

Keywords: ‘Galega’ black table olives; microbiological and chemical characterization; MAP; shelf life.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1 ENQUADRAMENTO TEÓRICO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. AZEITONA DE MESA	3
1.1.1 Caracterização	3
1.1.2 Métodos de Preparação	3
1.1.2.1 Azeitonas Verdes (Estilo Sevilhano ou Espanhol)	3
1.1.2.2 Azeitonas Pretas Oxidadas (Estilo Californiano ou Americano)	4
1.1.2.3 Azeitonas de Fermentação Natural (Estilo Grego)	4
1.1.2.4 Outros métodos de processamento	5
1.2. TEMPO DE VIDA ÚTIL	5
1.2.1 Definição	6
1.2.2 Guias para determinar o tempo de vida útil	7
1.2.3 Fatores que influenciam o tempo de vida útil	7
1.2.4 Estudos do tempo de vida útil	8
1.2.4.1 Métodos Diretos	8
1.2.4.2 Métodos Indiretos	10
1.2.5 Margem de Segurança	11
1.2.6 Indicadores nas análises de vida útil	11
1.2.6.1 Análises Sensoriais	11
1.2.6.2 Análises Físico-Químicas	12
1.2.6.3 Análises Microbiológicas	12
1.3. EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA	13
1.3.1 Principais gases utilizados em MAP	13
1.3.2 Materiais utilizados em MAP	14
1.3.3 Aplicação da MAP	15
1.3.4 Efeito da MAP em Frutos e Vegetais	16

1.4. ESTUDOS SOBRE A ATMOSFERA MODIFICADA EM AZEITONAS DE MESA DURANTE O TEMPO DE VIDA ÚTIL	16
1.5. OBJETIVOS	18
BIBLIOGRAFIA	19
2. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	27
3. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
3.1. CONCLUSÕES GERAIS	50
APÊNDICES	52
APÊNDICE I: RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS REALIZADAS AOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS	53
AI.1: Regressão da variável bolores	53
AI.2: Regressão da variável leveduras	55
AI.3: Regressão da variável Microrganismos a 30 °C	57
AI.4: Regressão da variável Bactérias Láticas	59
AI.5: Regressão da variável Fungos	61
AI.6: Resumo das médias em relação ao tipo de atmosfera	63
AI.7: Resumo das médias em relação à temperatura de armazenamento	64
APÊNDICE II: RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS REALIZADAS AOS PARÂMETROS QUÍMICOS	65
AII.1: Regressão da variável Acidez	65
AII.2: Regressão da variável Cloretos	67
AII.3: Regressão da variável Gordura	69
AII.4: Regressão da variável Humidade	71
AII.5: Regressão da variável Azoto	73
AII.6: Resumo das médias em relação ao tipo de atmosfera	75
AII.7: Resumo das médias em relação à temperatura de armazenamento	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores que influenciam o tempo de vida útil de um alimento.	8
Tabela 2 - Estatísticas da bondade de ajuste	53
Tabela 3 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	53
Tabela 4 - Parâmetros do modelo	54
Tabela 5 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	54
Tabela 6 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	54
Tabela 7 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	55
Tabela 8 - Estatísticas da bondade de ajuste	55
Tabela 9 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	55
Tabela 10 - Parâmetros do modelo	56
Tabela 11 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	56
Tabela 12 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	56
Tabela 13 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	57
Tabela 14 - Estatísticas da bondade de ajuste	57
Tabela 15 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	57
Tabela 16 - Parâmetros do modelo	58
Tabela 17 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	58
Tabela 18 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	58

Tabela 19 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	59
Tabela 20 - Estatísticas da bondade de ajuste	59
Tabela 21 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	59
Tabela 22 - Parâmetros do modelo	60
Tabela 23 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	60
Tabela 24 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	60
Tabela 25 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	61
Tabela 26 - Estatísticas da bondade de ajuste	61
Tabela 27 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	61
Tabela 28 - Parâmetros do modelo	62
Tabela 29 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	62
Tabela 30 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	62
Tabela 31 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	63
Tabela 32 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros microbiológicos analisados.	63
Tabela 33 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros microbiológicos analisados.	64
Tabela 34 - Estatísticas da bondade de ajuste	65
Tabela 35 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	65
Tabela 36 - Parâmetros do modelo	66

Tabela 37 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	66
Tabela 38 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	66
Tabela 39 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	67
Tabela 40 - Estatísticas da bondade de ajuste	67
Tabela 41 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	67
Tabela 42 - Parâmetros do modelo	68
Tabela 43 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	68
Tabela 44 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	68
Tabela 45 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	69
Tabela 46 - Estatísticas da bondade de ajuste	69
Tabela 47 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	69
Tabela 48 - Parâmetros do modelo	70
Tabela 49 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	70
Tabela 50 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	70
Tabela 51 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	71
Tabela 52 - Estatísticas da bondade de ajuste	71
Tabela 53 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	71
Tabela 54 - Parâmetros do modelo	72

Tabela 55 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	72
Tabela 56 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	72
Tabela 57 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	73
Tabela 58 - Estatísticas da bondade de ajuste	73
Tabela 59 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III	73
Tabela 60 - Parâmetros do modelo	74
Tabela 61 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera	74
Tabela 62 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo	74
Tabela 63 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura	75
Tabela 64 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros químicos analisados.	75
Tabela 65 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros químicos analisados.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada tipo de atmosfera em relação aos parâmetros microbiológicos analisados. 63
- Figura 2** - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada temperatura de armazenamento em relação aos parâmetros microbiológicos analisados. 64
- Figura 3** - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada tipo de atmosfera em relação aos parâmetros químicos analisados. 75
- Figura 4** - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada temperatura de armazenamento em relação aos parâmetros químicos analisados 76

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Modified Atmosphere/Atmosfera modificada
ANOVA	Analysis of Variance/Análise de variância
AOAC	Association of Analytical Communities/ Associação de Comunidades Analíticas
EVOH	Copolymer of Ethylene and Vinyl Alcohol/Copolímeros de etileno-álcool vinílico
FSAI	Food Safety Authority of Ireland/Autoridade de Segurança Alimentar da Irlanda
HACCP	Hazards Analysis and Critical Control Points/Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo
HPA	Health Protection Agency
IOC	International Olive Council/ Conselho Internacional de azeitona
IOOC	International Olive Oil Council/ Conselho Internacional de azeite
ISO	International Organization for Standardization/ Organização Internacional de Normalização
LAB	Lactic acid bactéria/Bactérias Láticas
LT	Laboratory temperature/Temperatura de Laboratório
MANOVA	Multivariate Analysis of Variance/Análise Multivariada de variância
MAP	Modified Atmosphere Packaging/Embalagem em Atmosfera Modificada
NP	Portuguese Standard/Norma Portuguesa
NZFSA	New Zealand Food Safety Authority/ Autoridade de Segurança Alimentar da Nova Zelândia
PE	Polyethylene/Polietileno
PET	Polyethylene terephthalate/Polietileno de tereftalato
PP	Polypropylene/Polipropileno
TVC	Total Viable Counts/Contagem total de microrganismos a 30°C

1 ENQUADRAMENTO TEÓRICO



1. INTRODUÇÃO

A azeitona é um fruto proveniente da oliveira (*Olea europaea* L.), a única espécie da família *Oleaceae* capaz de produzir frutos comestíveis (Pereira *et al.*, 2006; Ramalheiro, 2009). Está suspensa sob os ramos, por um pedúnculo. É considerada uma drupa de forma oval, formada por pericarpo (epicarpo ou casca, mesocarpo ou polpa e endocarpo ou caroço) e semente (Bianchi, 2003; Charoenprasert & Mitchell, 2012; Ghanbari *et al.*, 2012). O epicarpo, durante a fase de maturação, passa de verde-claro para roxo e castanho ou preto. O mesocarpo, com uma macia e carnuda polpa, representa 84-90% do peso total da azeitona e serve como reserva de todos os componentes, nomeadamente água (cerca de 75%) e óleo (cerca de 15% em azeitonas de cor verde e 30% em azeitonas pretas). O endocarpo contém a semente e exibe 13 a 30% do peso da fruta, podendo variar entre 2-20g na maioria das variedades (Bianchi, 2003; Ghanbari *et al.*, 2012).

O cultivo de azeitona é destinado, essencialmente, para extração de azeite (cerca de 90%) e produção de azeitona de mesa (cerca de 10%), ambos componentes importantes na dieta mediterrânica e largamente consumidos em todo o mundo, devido aos seus efeitos promotores de saúde (Almeida, 2013; Sousa *et al.*, 2011; Unal & Nergiz, 2003).

As azeitonas de mesa têm possuído grande importância na economia de vários países, sendo maioritariamente produzida nos países do Mediterrâneo (Almeida, 2013; Moreira, 2013; Pereira *et al.*, 2008). Hoje em dia são consideradas como um dos maiores vegetais fermentados das indústrias alimentares, devido à sua riqueza em ácidos gordos essenciais, proteína vegetal, vitaminas, minerais e fibra alimentar e por possuírem um alargado tempo de vida útil (Abriouel *et al.*, 2012; Arroyo-Lopez *et al.*, 2012).

Segundo a organização International Olive Oil Council (IOOC), na época de 2011/2012 produziram-se cerca de 2,432,500 tons de azeitonas de mesa em todo o mundo, prevendo um aumento na época de 2013/2014 para cerca de 2,574,500 tons, em que Portugal se destacava por ser o quarto país da Europa com maior produção de azeitonas de mesa, 11,900 tons, atrás da Grécia, Itália e Espanha (maior produtor no mundo, atingindo cerca de 519,100 tons) (IOOC, 2013). Recentemente, tem-se observado uma nova tendência em comercializar estes produtos de forma inovadora, através de embalagens mais atrativas ao consumidor, capazes de proporcionar um armazenamento seguro e ao mesmo tempo um aumento do seu tempo de vida de prateleira.

1.1. AZEITONA DE MESA

1.1.1 Caracterização

A azeitona de mesa é um produto preparado a partir de frutos de variedades apropriadas da espécie *Olea europaea* L., em estado de maturação conveniente, submetidos a tratamentos e operações que assegurem as suas características e boa conservação (NP-3034, 2012).

As variedades de azeitona utilizadas para a preparação de azeitonas de mesa dependem do volume e da forma do fruto, da proporção da polpa em relação ao caroço, do seu sabor, firmeza e facilidade que tem em se separar do mesmo (NP-3034, 2012). Para chegarem à mesa do consumidor necessitam de ser expostas a uma série de processos, que variam de região para região e conforme a variedade, para remover o seu composto fenólico mais predominante, conhecido por oleuropeína (Charoenprasert & Mitchell, 2012; IOC, 2014; Rodrigues, 2012). Para além destes fatores, os vários tipos de azeitona de mesa também se diferenciam tendo em conta as condições climáticas, o estado de desenvolvimento, a maturação do fruto e principalmente o tipo de preparação.

1.1.2 Métodos de Preparação

Os métodos de preparação da azeitona de mesa mais conhecidos destacam-se por terem uma etapa de tratamento alcalino, geralmente realizado numa solução aquosa com NaOH, para remover o tal sabor amargo da fruta (oleuropeína) (Gonçalves *et al.*, 2012). Os principais tipos de preparação e os mais comuns a nível internacional são o estilo Sevilhano ou Espanhol, para produção de azeitonas verdes; o estilo Californiano ou Americano, para produção de azeitonas pretas oxidadas; e o estilo Grego para obtenção de azeitonas de fermentação natural.

1.1.2.1 Azeitonas Verdes (Estilo Sevilhano ou Espanhol)

Após a colheita, as azeitonas de cor verde ou verde-amareladas chegam às indústrias e são devidamente selecionadas conforme o tamanho e lavadas para remoção de sujidade. Depois são submetidas a uma solução com hidróxido de sódio (NaOH) durante 8-

12 horas, cuja concentração e o tempo de resistência variam conforme a temperatura, a zona de cultivo e o grau de maturação do fruto para a oleuropeína ser removida (Bianchi, 2003; Sousa, 2008). As azeitonas são depois sujeitas a vários ciclos de lavagens, para remover o excesso de NaOH e são colocadas em salmoura com uma concentração de 5-9% (w/v) cloreto de sódio (NaCl) para a realização do processo de fermentação láctica. Assim que terminada, os frutos são novamente classificados de acordo com o tamanho e são embalados inteiros, sem caroço ou recheados com diversos produtos (Gómez *et al.*, 2006; Sousa, 2008).

1.1.2.2 Azeitonas Pretas Oxidadas (Estilo Californiano ou Americano)

As azeitonas são colhidas quando apresentam uma cor amarelo-palha ou verde (Gómez *et al.*, 2006), tornando-se preta após oxidação. Chegando à indústria, estes frutos podem passar diretamente para o processo de oxidação sem qualquer tipo de conservação ou podem ser armazenados em salmoura, com determinadas concentrações de NaCl, entre dois a seis meses, sob condições anaeróbias, com acidificação para um pH de 4 e com ácido acético e láctico para prevenir o processo de fermentação (Gómez *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006). As azeitonas são submetidas a tratamentos sucessivos de soluções diluídas com 1-2 % (w/v) de NaOH, para ser removida a oleuropeína e, durante intervalos específicos, são arejadas através de passagens de ar pelo líquido, para oxidarem uniformemente (Nogueira, 2012). Depois de várias lavagens, realizadas para remover o excesso de NaOH, são colocadas em salmoura para fermentarem e ao processo é adicionado gluconato ferroso ou lactato ferroso para manter a cor preta (Pereira *et al.*, 2006). Após calibragem, são embaladas em latas envernizadas por dentro ou em recipientes de vidro e, uma vez fechadas, são esterilizadas em autoclave (Gómez *et al.*, 2006).

1.1.2.3 Azeitonas de Fermentação Natural (Estilo Grego)

As azeitonas são colhidas quando se encontram maduras, mas não em demasia (Bianchi, 2003; Gómez *et al.*, 2006). São colocadas em salmoura com uma concentração de NaCl que ronda os 8-10% (w/v) ou os 6% em áreas mais frias, durante um período de tempo pré-determinado. Dá-se início ao processo de fermentação, que envolve uma população microbiana composta por bactérias gram-negativas, bactérias lácticas (LAB) e

leveduras, demorada devido à lenta difusão de compostos fermentáveis, uma vez que estes frutos não sofreram um tratamento alcalino. O sabor amargo das azeitonas é eliminado por solubilidade da oleuropeína na salmoura, atingindo o equilíbrio só aos oito, doze meses (Gómez *et al.*, 2006; Rodrigues, 2011). Após esse período, as azeitonas são expostas ao ar durante algumas horas, não mais do que 48 horas, para oxidarem e consequentemente, melhorarem a sua qualidade no que diz respeito à aparência e cor (Malheiro, 2010). Por fim, são embaladas em nova salmoura (Bianchi, 2003).

1.1.2.4 Outros métodos de processamento

Existem muitos outros métodos de preparação de azeitonas de mesa, que revelam a sua importância em regiões específicas (Rodrigues, 2011). No caso da azeitona galega, uma das principais variedades de azeitona comercializadas em Portugal (Ghanbari *et al.*, 2012; Moreira, 2013) ocorre uma preparação muito semelhante ao estilo Grego. Para o seu processamento são utilizados métodos caseiros e industriais que se baseiam em colocar o fruto em salmoura com uma concentração de 8% (w/v) NaCl, após calibragem e lavagem com água para remover qualquer sujidade existente. Ocorre fermentação natural composta por LAB e leveduras, durante cerca de 7 a 8 meses (Oliveira *et al.*, 2004). Para melhorarem a cor preta são expostas ao ar após fermentação. Uma vez classificadas por tamanho são embaladas em frascos de vidro, latas metálicas ou embalagens polietileno de tereftalato (PET). Recentemente foram introduzidas novas embalagens no mercado, as embalagens através de atmosfera modificada – *Modified Atmosphere Packaging* (MAP), de forma a proporcionar um prolongamento do tempo de vida útil destes frutos (Phillips, 1996; Sandhya, 2010).

1.2. TEMPO DE VIDA ÚTIL

O tempo de vida útil das azeitonas de mesa não está claramente definido. Tendo em conta que as azeitonas são vegetais fermentados com elevado grau de acidez, as indústrias indicam que o prazo validade a colocar nos rótulos deve ser de 2 a 3 anos, quando embaladas em salmoura (Panagou, 2004).

Em Portugal, as indústrias colocam no mercado azeitonas com prazo de vida de seis meses, quando embalados em atmosfera controlada. No entanto torna-se essencial realizar estudos que reforcem estes valores acima indicados.

1.2.1 Definição

São várias as definições atribuídas ao tempo de vida útil dos alimentos. De acordo com o Institute of Food Science and Technology (IFST), é considerado o período de tempo durante o qual um produto alimentar permanece seguro, conservando as suas características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e respeitando todos os dados nutricionais referidos no rótulo, quando armazenado sob determinadas condições (García-García *et al.*, 2008; García-García *et al.*, 2014; Henriques, 2008). Segundo o *Codex Alimentarius* o tempo de vida útil é o período durante o qual um produto mantém a sua segurança microbiológica e qualidade sensorial a temperaturas de armazenamento específicas (CAC/RCP 46, 1999). A *New Zealand Food Safety Authority* (2005) indica que se trata de um guia para os consumidores acerca do período de tempo em que os produtos podem ser conservados antes de se iniciar o processo de deterioração, desde que sejam seguidas quaisquer condições de armazenamento e o Regulamento (CE) nº 2073 (2005) refere como tempo de vida útil, o período correspondente ao intervalo de tempo que precede a data-limite de consumo dos produtos, ou a data de durabilidade mínima.

O tempo de vida útil é sem dúvida um indicador do intervalo de tempo em que um alimento, estando sob as condições de armazenamento específicas, mantém as suas características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas desejáveis, permitindo um consumo seguro até ao momento da sua deterioração. Este inicia logo na fase da preparação, sendo determinado essencialmente pela análise da degradação e decomposição microbiana ao longo do tempo, conforme as condições de armazenamento e de acordo com o tratamento a que o produto foi sujeito (Henriques, 2008; NZFSA, 2005).

A responsabilidade em estabelecer e validar o tempo de vida útil dos alimentos é, normalmente, do produtor. No entanto também cai sobre os produtores secundários, embaladores, fornecedores, retalhistas e supermercados (FSAI, 2014; NZFSA, 2005). Todos devem garantir que os alimentos se mantêm com qualidade e segurança ao longo de toda a cadeia alimentar, através da aplicação de boas práticas de higiene, segundo

programas pré-requisitos (PPR) e os programas pré-requisitos operacionais (PPR operacionais), e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo – *Hazards Analysis and Critical Control Points* (HACCP) (NP EN ISO 22000, 2005).

1.2.2 Guias para determinar o tempo de vida útil

Os guias são documentos de orientação concebidos para apoiar os operadores das empresas do sector da indústria alimentar a determinar a vida útil de um dado alimento. Os mesmos fornecem informações relevantes acerca da vida útil e descrevem as várias etapas necessárias para a sua determinação. De entre os vários guias existentes para ajudar a determinar o tempo de vida útil dos alimentos, a *New Zealand Food Safety Authority* (NZFSA) fornece informações acerca dos fatores que influenciam a vida útil de alimentos e os procedimentos a seguir para realizar o seu cálculo, a *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI) descreve as boas práticas para os operadores de empresas do sector alimentar estimarem, definirem e verificarem a segurança dos alimentos ao longo do seu período de vida útil e o documento do *Ministry for Primary Industries – New Zealand Government* (MPI-NZG) foi concebido com o propósito de apoiar os operadores do sector alimentar que processam, preparam e manipulam os alimentos a determinar o seu tempo de vida útil e aplicar a data limite apropriada. A prioridade é determinar o tempo de vida útil de alimentos prontos-a-comer refrigerados e o impacto de bactérias tolerantes ao frio (FSAI, 2014; MPI-NZG, 2014; NZFSA, 2005).

1.2.3 Fatores que influenciam o tempo de vida útil

A correta determinação do tempo de vida útil depende do tipo de ingredientes utilizados na preparação do alimento, do processo produtivo a que foi sujeito, do tipo de embalagem efetuado e das condições de armazenamento do mesmo (Henriques, 2008; NZFSA, 2005; Robertson, 2010).

Para além destes intervenientes na cadeia alimentar, existem outros fatores responsáveis pela variação da taxa de decomposição num alimento, conforme se verifica na Tabela 1. Para a maioria das empresas do sector alimentar os fatores-chave, intrínsecos e extrínsecos, mais importantes são o pH, a_w , temperatura de armazenamento e a embalagem do alimento (FSAI, 2014).

Tabela 1 – Fatores que influenciam o tempo de vida útil de um alimento.

Deterioração Não-Microbiana	Crescimento Microbiano	
	Propriedades Intrínsecas	Propriedades Extrínsecas
Alterações da humidade	pH e tipo de ácido presente	Temperatura de produção, armazenamento e distribuição
Alterações químicas	Atividade da água (a_w)	Embalagem
Alterações induzidas pela luz	Potencial Redox	Atmosfera
Alterações físicas	Barreiras Naturais	Humidade relativa
Outros	Conteúdo nutricional e disponibilidade dos alimentos	Processamento de Alimentos
	Microflora natural ou adicionada	Boas práticas de Higiene e Fabrico
	Substâncias antimicrobianas	Armazenamento e distribuição
	Qualidade microbiológica dos ingredientes	Práticas do consumidor
	Composição e formulação dos alimentos	Procedimentos baseados no HACCP
	Montagem e estrutura dos alimentos	

Fonte: (FSAI, 2014; NZFSA, 2005).

1.2.4 Estudos do tempo de vida útil

Os estudos do tempo de vida útil são meios objetivos e metódicos para determinar o período de conservação razoavelmente expectável de um produto, sem alteração da sua qualidade (NZFSA, 2005). Para a sua realização podem ser idealizados dois métodos. O método direto consiste em armazenar o produto sob determinadas condições, durante um período de tempo maior que o tempo de vida útil do próprio, e verificar em intervalos regulares quando se inicia o processo de deterioração. Já o método indireto permite um armazenamento acelerado ou uma modelagem preditiva microbiológica para determinar o tempo de vida útil (NZFSA, 2005).

1.2.4.1 Métodos Diretos

Para o cálculo do tempo de vida útil de um alimento segundo o método direto, é necessário ter em conta seis passos, seguidamente enumerados.

1º Passo

Identificar as causas de degradação do alimento – cada produto tem o seu conjunto de fatores capazes de limitar o seu tempo de vida útil. A degradação relacionada com o produto envolve a utilização de matérias-primas cruas e sua interação, a atividade da água, pH, presença de gases, uso de aditivos, etc.. A degradação relacionada com o processo

envolve o tipo de processamento, a embalagem e o seu armazenamento (Ferreira, 2013; Guerreiro, 2014; NZFSA, 2005).

2º Passo

Selecionar os ensaios a realizar – é necessário selecionar os ensaios adequados para determinar a segurança e qualidade do produto. Normalmente os ensaios são divididos em quatro categorias: avaliação microbiológica, química, física e sensorial (Ferreira, 2013; Guerreiro, 2014; NZFSA, 2005).

3º Passo

Planear um estudo de vida útil – quando se prepara detalhadamente o estudo de vida útil deve-se ter em consideração os seguintes pontos: quais os ensaios que é preciso realizar; quanto tempo e com que frequência serão realizados os ensaios; quantas amostras serão analisadas em cada ensaio, quantas amostras serão necessárias durante todo o período de estudo; quando é que o estudo será realizado (Ferreira, 2013; Guerreiro, 2014; NZFSA, 2005).

4º Passo

Realizar do estudo de vida útil – durante o estudo as amostras devem ser armazenadas nas em condições semelhantes às reais ou com temperaturas e humidade conhecidas, com controlo regular. Depois de submetidas a várias análises durante intervalos de tempo pré-determinados, verifica-se até que ponto se inicia o processo de deterioração (Ferreira, 2013; Guerreiro, 2014; NZFSA, 2005).

5º Passo

Determinar o tempo de vida útil - usando toda a informação retida por todos os passos anteriores, decide-se quanto tempo o produto foi capaz de se manter seguro e com qualidade aceitáveis. O tempo de vida útil para o produto deve ser aquele que for menor nos ensaios. Neste momento o tempo de vida útil foi estimado, baseado em condições ideais de armazenamento. A vida útil do alimento deve ser razoável, não a ideal, para se ter uma margem de segurança (Ferreira, 2013; Guerreiro, 2014; NZFSA, 2005).

6 ° Passo

Continuar a monitorizar a vida útil do alimento – após o primeiro estudo de vida útil, devem ser feitos outros estudos, principalmente para fatores que o estudo indicou serem os mais importantes num produto, por exemplo a acidez, o nível de degradação dos microrganismos, etc., e também sempre que ocorram modificações no processo ou no produto. Deve-se também investigar as reclamações por parte dos consumidores. Todos estes estudos levarão a um reajustamento do tempo de vida útil (monitorização) (Ferreira, 2013; Guerreiro, 2014; NZFSA, 2005).

1.2.4.2 Métodos Indiretos

Os métodos indiretos são úteis para estudar produtos com longos tempos de vida. São classificados como uma tentativa de prever o tempo de vida útil de um produto sem terem que recorrer a um processo de armazenamento, cuja duração é igual à vida útil efetiva do produto (NZFSA, 2005). Os testes mais comuns são:

- a) Dados Bibliográficos – a vida útil do produto é estimada de acordo com dados publicados por entidades idóneas e internacionalmente reconhecidas. Contudo, por vezes são escassos os dados encontrados e os mesmos limitam-se a determinados alimentos (Ferreira, 2013; Henriques, 2008).
- b) Teste de aceleração da vida útil – o período de tempo é encurtado pelo aumento intencional da taxa de deterioração, normalmente devido ao aumento da temperatura de armazenamento. Esses resultados são então utilizados para estimar o tempo de vida útil sobre condições normais de armazenamento (Henriques, 2008; NZFSA, 2005).
- c) Modelos preditivos – baseiam-se em equações matemáticas que utilizam informações de bases de dados científicos para prever o crescimento microbiano sob condições definidas. Para a realização do cálculo é essencial recolher informação sobre as mudanças que ocorrem quando o produto se deteriora, bem como as suas propriedades e embalagem. A maioria dos modelos de previsão são específicos para determinados tipos de microrganismos (Henriques, 2008; NZFSA, 2005).

Também são conhecidos como métodos indiretos os testes de comercialização (tempos de vida de produtos similares utilizados para estabelecer o tempo de vida do alimento em estudo); testes de distribuição (alimento recolhido no local de venda e armazenado no laboratório sob condições normais de armazenamento); insatisfação do cliente (utilizado em conjunto com outros testes, inclui o contacto da empresa no rotulo do alimento para receber reclamações por parte dos clientes, quando insatisfeitos) e testes de desafio (adição intencional de microrganismos para determinar se a especificação do alimento e as condições de armazenamento impedem o seu crescimento durante o tempo de vida útil desejado para o produto) (Mendes, 2009; Tavares, 2013).

1.2.5 Margem de Segurança

Uma vez que o tempo de vida útil de um alimento não apresenta valores fixos, torna-se essencial aplicar uma margem de segurança, de forma a manter o produto sempre seguro até ao momento de consumo (MPI-NZG, 2014). No entanto, esta apresenta a desvantagem de reduzir a durabilidade do produto. Em contra partida permite ao produtor verificar qualquer variação que possa ocorrer ao longo do processo de produção, armazenamento, distribuição e consumo (AESAN, 2011; Henriques, 2008; Tavares, 2013).

1.2.6 Indicadores nas análises de vida útil

De forma a obter-se uma abordagem segura nos estudos de vida útil, é essencial determinar indicadores capazes de avaliar a qualidade do alimento. Estes incluem análises sensoriais, físico-químicas e microbiológicas, sendo os dois últimos amplamente usados para a realização de estudos do tempo de vida útil (Guerreiro, 2014; Henriques, 2008; Moreno, 2011).

1.2.6.1 Análises Sensoriais

Análises realizadas ao odor, aparência, sabor e textura do alimento. São normalmente efetuadas para monitorizar e registar mudanças óbvias que ocorram ao longo do tempo. Essencialmente determinam as propriedades sensoriais ou organoléticas dos produtos através de testes analíticos (identificam o momento em que houve alteração no produto, através de probabilidades) e hedónicos (através de uma escala graduada modelam

a perda de características do produto ao longo do tempo). Apesar de existir um painel de provadores treinados, capazes de identificar notavelmente as características do alimento, este tipo de avaliação não oferece uma visão precisa do seu tempo de vida útil (Moreno, 2011; NZFSA, 2005).

1.2.6.2 Análises Físico-Químicas

Análises realizadas, maioritariamente, ao pH, a_w ; textura e azoto básico. Baseiam-se em reações químicas e bioquímicas que determinam a degradação da qualidade do alimento, com é o caso de escurecimento enzimático e não enzimático, oxidação, normalmente lipídica, etc. (Moreno, 2011; Tavares, 2013).

- a) Análises Físicas – incluem a medição da textura e cor do alimento, o tipo de embalagem e determinação das melhores, das piores e das médias condições de varejo (García-García *et al.*, 2014; NZFSA, 2005).
- b) Análises químicas - detetam qualquer alteração na qualidade do alimento ao longo do seu tempo de vida útil.

1.2.6.3 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas permitem verificar a quantidade de microrganismos presentes no alimento (Ferreira, 2013; Henriques, 2008). Analisam normalmente os agentes patogénicos, a flora de alteração e as toxinas (Henriques, 2008; Moreno, 2011). Permitem estimar as alterações ocorridas ao longo do tempo no número e tipo de microrganismo presente no alimento e servem para avaliar a qualidade e segurança do alimento. Os resultados obtidos podem ser confrontados com limites estipulados segundo linhas de orientação, como é o caso da *Health Protection Agency* (HPA, 2009), ou conforme indicações de agências ou autoridades alimentares reconhecidas e regulamentos de cumprimento obrigatório (Tavares, 2013). De acordo com o guia HPA, para a interpretação dos resultados obtidos relativamente à contagem de microrganismos aeróbios a 30°C, os alimentos são classificados em 13 diferentes categorias, e os resultados são satisfatórios, aceitáveis a insatisfatórios. No caso das azeitonas de mesa, uma vez que se tratam de vegetais fermentados, pertencem à categoria de alimentos nº 13, verificando-se que os valores obtidos para a contagem de colónias aeróbias não são aplicáveis como

critérios de qualidade, pelo facto das azeitonas terem uma flora natural que não seja prejudicial em termos de segurança alimentar. No entanto, o produto torna-se insatisfatório caso a identificação de leveduras seja $> 10^6$ ufc/g ou a identificação de bactérias lácticas seja $> 10^8$ ufc/g, a menos que tenham sido adicionadas como auxiliadoras no processamento (HPA, 2009). Adicionalmente realizam-se outras análises durante o tempo de vida útil das azeitonas que recai nas contagens de microrganismos patogénicos, tais como pesquisas/contagens de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e Estafilococos coagulase positiva, e nos indicadores de contaminação *Escherichia coli* e esporos de Clostrídios sulfito-redutores (Moreno, 2011; Pereira *et al.*, 2008; Tavares, 2013).

1.3. EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA

A maioria dos sistemas de embalagem atuam no alimento, controlando a atmosfera que o envolve de forma a aumentar o seu tempo de vida útil. No entanto a escolha da embalagem depende essencialmente do tipo de alimento que se pretende embalar (FSAI, 2014).

O embalamento em atmosfera modificada ou *Modified Atmosphere Packaging* (MAP) é considerado um dos mais importantes tipos de conservação utilizados na indústria alimentar (Xing *et al.*, 2010). A MAP é um método conhecido por modificar a composição do ar que envolve o produto embalado, com um gás específico ou uma mistura de gases, de forma a prolongar o seu tempo de vida útil e melhorar a sua qualidade organolética, controlando as reações enzimáticas ou bioquímicas que ocorram e a população microbiana existente (Air Liquide, 2012; Chapman & Hall, 1998; Degirmencioglu, 2011; Phillips, 1996; Soccol & Oetterer, 2003).

1.3.1 Principais gases utilizados em MAP

Os três principais gases utilizados em MAP são o oxigénio (O_2), o dióxido de carbono (CO_2) e o azoto (N_2), apesar de a legislação acerca de aditivos permitir a utilização determinados gases nobres, nomeadamente, o hélio (He) e o árgon (Ar) (Air Liquide, 2012; Soccol & Oetterer, 2003). A concentração de cada gás é estabelecida de acordo com o produto que se está a embalar, sendo influenciada pela flora microbiana, sensibilidade do

produto ao O₂ e ao CO₂ e estabilidade da cor desejada (Chapman & Hall, 1998; Phillips, 1996; Sandhya, 2010). O CO₂ é um gás incolor com propriedades bacteriostáticas e fungistáticas. É altamente solúvel em água e gordura, podendo provocar o colapso da embalagem se não for devidamente controlado. Como é rapidamente dissolvido na água, produz ácido carbónico (H₂CO₃) que aumenta a acidez da solução e reduz o pH. O seu efeito inibidor aumenta conforme a diminuição da temperatura e é eficaz em proporções superiores a 20% da atmosfera, atrasando o crescimento e reduzindo a velocidade de multiplicação de bactérias e bolores. Os níveis de O₂ são o mais baixo possível numa MAP, para inibir o crescimento de bactérias aeróbias e para reduzir os efeitos oxidativos nas gorduras. Possui baixa solubilidade em água. Em determinados produtos a sua concentração é mais alta para manter a cor vermelha das carnes, diminuir a perda de líquidos e cor nos peixes magros e permitir a respiração de frutas e vegetais. O N₂ é um gás inerte que é utilizado para prevenir o colapso da embalagem, uma vez que não é absorvido pelo produto por ser pouco solúvel em água e gordura. Também é utilizado como substituto do oxigénio para prevenir a rancificação e o crescimento de microrganismos aeróbios (Baroni *et al.*, 2009; Phillips, 1996; Sandhya, 2010; Santos, 2008). O Ar apareceu recentemente na Europa como uma alternativa ao N₂ para utilizações em MAP, por ser também ele inerte inodoro e insípido. É mais eficaz no sentido de deslocar mais facilmente o O₂, uma vez que ambos apresentam similares tamanhos atómicos. Também tem como vantagem a sua eficaz solubilidade em gordura, resultando numa melhor permeabilidade de CO₂, sal e ácidos para células bacterianas (Herbert *et al.*, 2013).

Empobrecendo os níveis de O₂ e enriquecendo os níveis de CO₂ cria-se uma MAP capaz de reduzir a taxa de respiração do produto e a produção de etileno (C₂H₄) (Majidi *et al.*, 2014; Soliva-Fortuny & Martin-Belloso, 2003). A MAP é aplicada a vários produtos alimentares, e a sua mistura de gases depende do material de embalagem que se utiliza, do tipo de produto que se embala e da sua temperatura de armazenamento (Caleb *et al.*, 2013; Sandhya, 2010).

1.3.2 Materiais utilizados em MAP

Os plásticos flexíveis e semirrígidos e os plásticos laminados são os materiais mais utilizados em MAP, por variarem quanto à sua estrutura química e por apresentarem diversas propriedades, conforme a sua composição, processo de fabrico e aditivos

utilizados. A maioria das embalagens derivam de um ou mais destes quatro polímeros: cloreto de polivinilo (PVC), polietileno tereftalato (PET), polietileno (PE), polipropileno (PP) (Barbosa, 2014; Phillips, 1996; Poças & Oliveira, 2001). Os filmes que formam a embalagem variam conforme a taxa de permeabilidade ao oxigênio e atuam de forma a minimizar ou controlar as trocas existentes entre o interior e exterior da embalagem (Barbosa, 2014).

1.3.3 Aplicação da MAP

Os produtos alimentares reagem de formas diferentes quando embalados com atmosfera modificada (AM), em grande parte, por causa da taxa de respiração (Barbosa, 2014). Os frutos e vegetais são produtos metabolicamente ativos, capazes de consumir O₂ e produzir CO₂ enquanto estão embalados. Desta forma a MAP pode ser criada passivamente pelo produto (MAP passiva) ou intencionalmente, introduzindo uma mistura de gases dentro da embalagem (MAP ativa) (Mastromatteo *et al.*, 2010). Esta última baseia-se, como já dito anteriormente, na introdução de uma mistura de gases desejada, na fase de embalamento, que substitui a atmosfera normal à volta do produto. As modificações passivas ocorrem a partir da combinação de dois processos naturais, a respiração do produto e a transferência de gases através da embalagem (Caleb *et al.*, 2013; Poças & Oliveira, 2001). Se a permeabilidade do filme da embalagem se adapta à respiração do produto, é estabilizado um equilíbrio da atmosfera modificada na própria e o tempo de vida útil do produto aumenta (Jacxsens *et al.*, 2000; Sandhya, 2010).

A temperatura tem sido identificada como o maior fator externo que influencia tanto a taxa de respiração do produto como a permeabilidade do filme. Assim, a aplicação da MAP objetiva-se em manter uma atmosfera desejada dentro de um intervalo específico de temperatura. Uma vez que a temperatura esteja fora desse intervalo, a atmosfera na embalagem também é alterada, tornando o produto inadequado ou até prejudicial para a saúde do consumidor.

1.3.4 Efeito da MAP em Frutos e Vegetais

Alguns trabalhos publicados afirmam que o uso de MAP em frutos e vegetais com baixas temperaturas resulta num armazenamento mais eficaz e mais seguro, prolongando o tempo de vida útil do produto (Degirmencioglu, 2011; Phillips, 1996; Sandhya, 2010).

A composição da mistura de gases mais adequada para embalar azeitonas de mesa ainda não está claramente definida. Há autores que testam a MAP utilizando 40% de CO₂, 30% de O₂ e 30% de N₂ (Panagou, 2004; Panagou *et al.*, 2002), 35% CO₂ e 65% N₂ (Degirmencioglu, 2011) e Mantzouridou & Tsimidou (2011) chegaram a avaliar azeitonas de mesa com 100% de N₂. Neste trabalho serão analisadas amostras de azeitonas de mesa pretas da variedade Galega acondicionadas em atmosfera normal e AM (20% de CO₂ e cerca de 80% de Ar).

1.4. ESTUDOS SOBRE A ATMOSFERA MODIFICADA EM AZEITONAS DE MESA DURANTE O TEMPO DE VIDA ÚTIL

Vários autores têm estudado o tempo de vida de azeitonas de mesa e os seus métodos de conservação. No entanto verifica-se que existe uma escassa informação acerca das mudanças nas características microbiológicas e físico-químicas de azeitonas de mesa pretas naturais armazenadas a diferentes atmosferas e temperaturas.

Panagou (2004) realizou um estudo acerca do efeito de diferentes tratamentos de embalagem nas características microbiológicas e físico-químicas das azeitonas verdes não tratadas da variedade *Conservolea*, na Grécia. Desta forma o seu objetivo foi estudar o efeito de embalagem em salmoura acidificada e de embalagens modificadas (40% CO₂/30% N₂/30% O₂, vácuo e ar) nas características microbiológicas e físico-químicas das azeitonas verdes não tratadas da variedade *Conservolea* embaladas em sacos de polietileno durante 180 dias à temperatura de 20°C. No final do tempo de armazenamento concluiu que a embalagem a vácuo, nas condições anteriormente mencionadas, é o melhor tratamento de preservação expectando um tempo de vida útil de 23 meses.

Em 2013 Sánchez-Gómez *et al.* estudaram o tempo de vida útil de azeitonas de mesa verdes do estilo Espanhol. O objetivo destes autores passou por analisar as evoluções das características físico-químicas e sensoriais de azeitonas de mesa de diferentes

variedades, nomeadamente *Gordal*, *Manzanilla* and *Hojiblanca*, preparadas comercialmente pelo estilo Espanhol, em várias formas de apresentação (inteiras, sem caroço ou recheadas com pimenta, alho e pasta de anchova) e armazenadas em salmoura, durante período de tempo de três anos sob condições reais de preservação, com temperaturas de armazenamento de $22,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, que variaram para $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Inverno e $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Verão. Após o tempo de vida útil estabelecido, verificaram que as azeitonas verdes não sofreram mudanças que afetassem a sua qualidade, sendo classificadas, segundo métodos de avaliação sensoriais do IOC, como de alta qualidade dotadas até ao limite máximo com características específicas de cada variedade e preparação comercial.

Um estudo idêntico a Sánchez-Gómez *et al.* (2013) foi realizado por García- García *et al.* (2014) em que abordaram as mudanças nas características físico-químicas e sensoriais de azeitonas de mesa maduras de variedades Espanholas durante um período de três anos acondicionadas em salmoura. As variedades *Gordal*, *Manzanilla*, *Hojiblanca* e *Cacereña* foram avaliadas quanto às suas características físico-químicas e sensoriais durante um período de três anos de acordo com as suas apresentações (simples e sem caroço) e armazenadas sob condições reais, com temperaturas de $22,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, que variaram para $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Inverno e $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Verão. Após o período de armazenamento, maioria das amostras foram classificadas como sendo de alta qualidade dotadas até ao limite máximo com características específicas de cada variedade e preparação comercial, e apenas a variedade *Gordal* foi classificada como sendo de boa qualidade com um grau de maturação adequado e dotada com as características específicas da variedade e preparação comercial, de acordo com os métodos de avaliação sensoriais do IOC. Tendo em conta estes resultados, os autores concluíram que as azeitonas de mesa estudadas não sofreram alterações que afetassem significativamente a sua qualidade durante os três anos de armazenamento estabelecidos como tempo de vida útil.

Neste trabalho pretende-se realizar um estudo do tempo de vida útil de azeitonas de mesa pretas da variedade Galega, analisando o efeito de duas diferentes condições de embalamento (MAP com uma composição de 80% de Argon e 20% de CO_2 e embalagem com atmosfera normal (ar)), sem salmoura, e três temperaturas de armazenamento ($5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $44 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) nas características microbiológicas e químicas ao longo de cerca de sete meses (tempo de vida mais alargado que o que habitualmente as indústrias

aplicam aos mesmos tipos de produtos, com condições de embalagem semelhantes, no mercado (1 mês)). O objetivo baseia-se em determinar qual a melhor condição de embalagem para as azeitonas de mesa e qual a temperatura mais adequada para armazenar as azeitonas em estudo.

1.5. OBJETIVOS

Assim como vários países da bacia do mediterrâneo, Portugal apresenta uma larga tradição na produção de diversas variedades de azeitona de mesa, nomeadamente as azeitonas de mesa preta de variedade Galega. As formas de embalagem deste produto variam, desde frascos de vidro, latas metálicas ou embalagens de polietileno de tereftalato (PET). A nova tendência de comercialização tem sido através de atmosfera controlada, nomeadamente a MAP, com o objetivo de prolongar o tempo de vida útil destes frutos.

O objetivo principal deste trabalho passa por realizar um estudo do binómio tipo de atmosfera/temperatura ao longo de 207 dias de armazenamento, que permita aumentar o tempo de vida útil da azeitona de mesa em estudo.

Para tal pretende-se:

- Estudar os efeitos das duas atmosferas e três temperaturas diferentes nos parâmetros microbiológicos analisados ao longo do tempo (Contagem de *E.coli*, Deteção e Contagem de Esporos de Clostrídios sulfito-redutores, Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, Pesquisa de *Salmonella* spp., Contagem de *Listeria monocytogens*, Contagem de bolores e leveduras, Contagem de microrganismos a 30°C, Identificação de bactérias lácticas, Identificação de fungos);
- Estudar os efeitos das duas atmosferas e três temperaturas diferentes nos parâmetros químicos analisados ao longo do tempo (acidez, cloretos, gordura, humidade e azoto).
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos para determinar a melhor atmosfera para o embalagem das azeitonas galegas e a melhor temperatura de armazenamento;

- Analisar criteriosamente os resultados e compara-los com valores de referência.

BIBLIOGRAFIA

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M. A. F., Perez-Pulido, R., & Galvez, A. (2012). "Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Alorena green table olives". *Food Microbiology*, 32(2), pp. 308-316, p. 308, 309.
- AESAN (2011). "Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in certain food products". *Revista del Comité Científico de la AESAN* nº 14, pp. 43-63.
- Air Liquide (2012). "Aligal - Uma gama de atmosferas de conservação dedicada aos produtos agroalimentares". Disponível online: <http://www.airliquide.pt/file/otherelement/pj/53/a3/e8/16/folleto%20aligal-ptcorregido2617399851435651635.pdf>. Acedido a 20 de Dezembro, 2014.
- Almeida, S. C. (2013). "Contributo para a caracterização do processo produtivo e da composição fenólica de "Azeitonas de conserva Transmontanas". Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. pp. 75, p. 1-13.
- Arroyo-Lopez, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodriguez-Gomez, F., Jimenez-Diaz, R., Garcia-Garcia, P. & Garrido-Fernandez, A. (2012). "Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms?". *International Journal of Food Microbiology*, 160(1), pp. 42-49, p. 42-44.
- Barbosa, C. (2014). "Legumes minimamente processados e pré-cozidos mantidos em atmosfera modificada". Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. pp. 267, p. 9-20.

- Baroni, B., Baroni, M. R., & Torri, L. (2009). "Modified Atmosphere". Disponível online: <http://www.foodpackages.net/freepress/it/download.php>. Acedido a 11 de Dezembro, 2014.
- Bianchi, G. (2003). "Lipids and phenols in table olives". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(5), pp. 229-242.
- CAC/RCP 46 (1999). "Code Of Hygienic Practice For Refrigerated Packaged Foods With Extended Shelf life". Codex Alimentarius Commission (CAC), CAC/RCP 46 - (1999). pp. 1-20.
- Caleb, O. J., Mahajan, P. V., Al-Said, F. A., & Opara, U. L. (2013). "Modified Atmosphere Packaging Technology of Fresh and Fresh-cut Produce and the Microbial Consequences-A Review". *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), pp. 303-329, p. 303-306.
- Chapman & Hall (1998). "Applications of Modified Atmosphere Packaging of foods". Second Edition, Editado por Blakiston, B.A. New York. Disponível online: <http://books.google.pt/books?id=78sOfd9OgXYC&printsec=frontcover&dq=Modified-atmosphere+packaging&hl=pt-PT&sa=X&ei=0NprVJ2RBcPlasyHgPgO&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=Modified-atmosphere%20packaging&f=false>. Acedido a 26 de Novembro, 2014.
- Charoenprasert, S., & Mitchell, A. (2012). "Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), pp. 7081-7095, p. 7081.
- Degirmencioglu, N. (2011). "Influence of Temperature and Modified Atmosphere on the Microbial Profile of Packed Gemlik Dry-salted Olives". *Journal of Food Safety*, 31, pp. 115-124.
- Ferreira, M. D. M. (2013). "Revalidação dos prazos já existentes de produtos de padaria e pastelaria e controlo de qualidade". Relatório de Estágio apresentado para obtenção de grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. pp. 84, p. 17-23.
- FSAI (2014). "Guidance Note No. 18 Validation of Product Shelf-life (Revision 2)". Food Safety Authority of Ireland (FSAI), Dublin. pp. 1-56.

- García-García, P., Lopez-Lopez, A., & Garrido-Fernandez, A. (2008). "Study of the shelf life of ripe olives using an accelerated test approach". *Journal of Food Engineering*, 84(4), pp. 569-575, p. 569, 570.
- García-García, P., Sanchez-Gomez, A. H., & Garrido-Fernandez, A. (2014). "Changes of physicochemical and sensory characteristics of packed ripe table olives from Spanish cultivars during shelf-life". *International Journal of Food Science and Technology*, 49 (3), pp. 895-903.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., & Saari, N. (2012). "Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)- A Review". *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), pp. 3291-3340, p. 3297.
- Gómez, A. H. S., García-García, P., & Navarro, L. R. (2006). "Trends in table olive production - Elaboration of table olives". *Grasas Y Aceites*, 57, pp. 86-94.
- Gonçalves, E. D., Medeiros, R. M. L., Krolow, A. C. R., & Vizzotto, M. (2012). "Elaboração de azeitonas de mesa de qualidade". OLIVEIRA, A. F. de Oliveira no Brasil: tecnologias de produção. Belo Horizonte. pp. 593-628. Disponível online: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/939338>. Acedido a 26 de Novembro, 2014.
- Guerreiro, J. S. (2014). "Tempo de vida de prateleira". Apontamentos teóricos de Controlo Físico-Químico e Microbiológico. Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo. pp. 1-47.
- Henriques, A. R. B. C. S. (2008). "Avaliação da Vida Útil de Refeições “Cook-Chill” e “Cook-Freeze”: Indicadores Microbiológicos, Físico-Químicos e Sensoriais". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. pp. 89, p. 26.
- Herbert, U., Rossaint, S., Khanna, M.-A., & Kreyenschmidt, J. (2013). "Comparison of argon-based and nitrogen-based modified atmosphere packaging on bacterial growth and product quality of chicken breast fillets". *Poultry Science* (92), pp. 1348–1356, p. 1348.

- HPA (2009). "Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market". London: Health Protection Agency (HPA), November 2009. pp. 1-34.
- INSA (2010). "Detalhe Alimento". Disponível online: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalheAlimento.aspx?ID=IS703#top>. Acedido a 26 de Março, 2015.
- IOC (2014). "About olives". Internacional Olive Council (IOC). Disponível online: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/77-about-olives>. Acedido a 13 de outubro de 2014.
- IOOC (2013). "Table Olives Balances 2013". Internacional Olive Oil Council (IOOC). Disponível online: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/134-approved-balances>. Acedido a 13 de outubro de 2014.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., De Rudder, T., & Debevere, J. (2000). "Designing equilibrium modified atmosphere packages for fresh-cut vegetables subjected to changes in temperature". *Food Science and Technology*, 33(3), pp. 178-187, p. 178, 179.
- Majidi, H., Minaei, S., Almassi, M., & Mostofi, Y. (2014). "Tomato quality in controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and cold storage". *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 51(9), pp. 2155-2161, p. 2155, 2156.
- Malheiro, R. M. S. (2010). "Influência da cultivar nas características físico-químicas, sensoriais e biológicas de azeitonas verdes descaroçadas". Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. pp. 120, p. 3-8.
- Mantzouridou, F., & Tsimidou, M. Z. (2011). "Microbiological quality and biophenol content of hot air-dried Thassos cv. table olives upon storage". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), pp. 786-795, p. 786, 787.
- Mastromatteo, M., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2010). "Combined Use of Modified Atmosphere Packaging and Natural Compounds for Food Preservation". *Food Engineering Reviews*, 2(1), pp. 28-38, p. 28, 29.

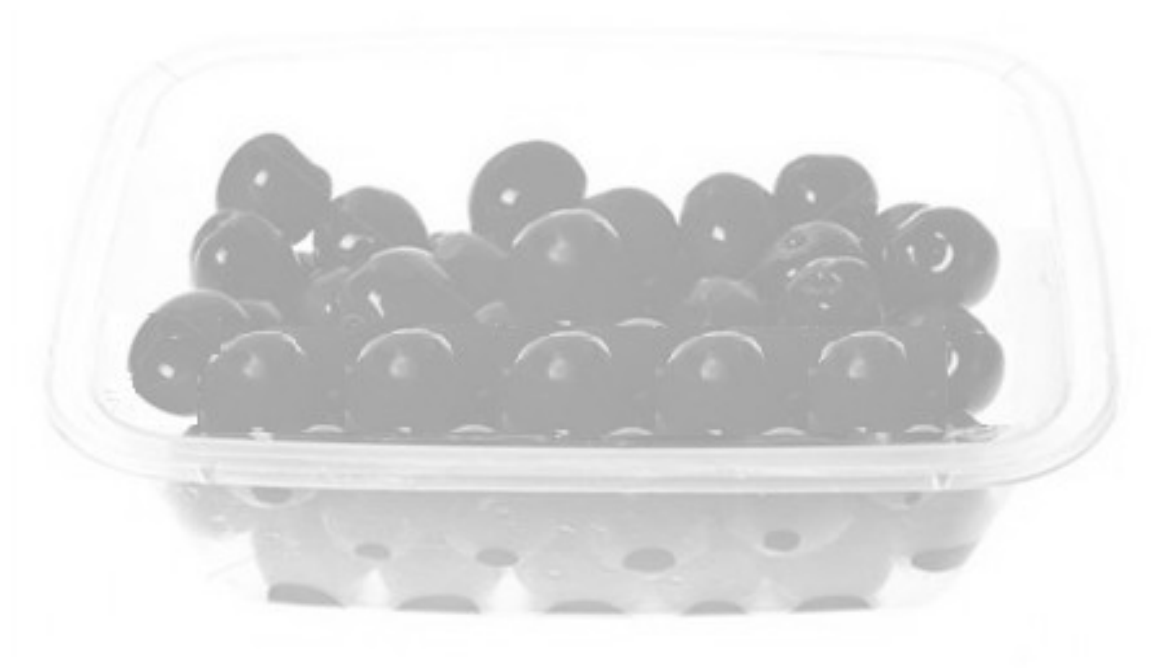
- Mendes, P. V. F. (2009). "Determinação da vida útil de 2 grupos de alimentos prontos a comer comercializados em estabelecimentos de take away". Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. pp. 97, p. 15-31.
- Moreira, L. P. P. F. (2013). "Produção de Azeitona de Mesa ao Natural Fermentada por Estirpes de Bactérias Lácticas Potencialmente Probióticas". Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. pp. 94, p. 1-13.
- Moreno, A. C. C. (2011). "Implementação de sistema de segurança alimentar numa unidade de restauração". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. pp.197, p. 70, 71.
- MPI-NZG (2014). "Guidance Document: How to Determine the Shelf Life of Food". Ministry for Primary Industries - New Zealand Government (MPI-NZG). pp. 34.
- Nogueira, F. A. M. (2012). "Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos". Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. pp. 98, p. 1-17.
- NP-3034 (2012). "Azeitonas de mesa: definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem". Norma Portuguesa (NP) 3034 de 2012. Instituto Português da Qualidade.
- NP EN ISO 22000 (2005). "Sistemas de gestão da segurança alimentar Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar". Instituto Português da Qualidade. pp. 53.
- NZFSA (2005). "A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods". PO Box 2835, Wellington, New Zealand: New Zealand Food Safety Authority (NZFSA). pp. 1-32.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., & Peres, C. (2004). "Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety". *Grasas Y Aceites*, 55(3), pp. 219-226.

- Panagou, E. Z. (2004). "Effect of different packing treatments on the microbiological and physicochemical characteristics of untreated green olives of the Conservolea cultivar". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(8), pp. 757-764.
- Panagou, E. Z. (2006). "Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C". *Food Science and Technology*, 39(4), pp. 323-330.
- Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Katsaboxakis, K. Z. (2002). "Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20°C". *International Journal of Food Science and Technology*, 37(6), pp. 635-641.
- Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A., & Estevinho, M. L. (2008). "Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects". *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), pp. 2895-2902.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R. & Bento, A. (2006). "Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), pp. 8425-8431, p. 8425.
- Phillips, C. A. (1996). "Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce". *International Journal of Food Science and Technology*, 31(6), pp. 463-479.
- Poças, M. F. F., & Oliveira, F. A. R. (2001). "Manual de Embalagem para Hortofrutícolas Frescos". ESB/UCP - Porto, 2001 / 1ª Edição. pp. 29, p. 14, 18.
- Ramalheiro, J. P. S. C. (2009). "Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar - Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. pp. 51, p. 1-3.
- Regulamento (CE) nº 2073. (2005). "Regulamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de Dezembro de 2005". Jornal Oficial da União Europeia, L 338/1. Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas.

- Robertson, G. L. (2010). "Food Packaging and Shelf Life - A Practical Guide". Taylor and Francis Group, Broken Sound Parkway. pp. 408, p. 1-14, 297.
- Rodrigues, N. M. S. (2012). "Preparação de Pastas com “Azeitona de Mesa Transmontana””. Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. pp. 100, p. 1-13.
- Rodrigues, N. M. S. F. (2011). "Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve". Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve. pp. 95, p. 1-14.
- Sanchez-Gomez, A. H., Garcia-Garcia, P., & Fernandez, A. G. (2013). "Spanish-style green table olive shelf-life". *International Journal of Food Science and Technology*, 48(8), pp. 1559-1568.
- Sandhya. (2010). "Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs". *Food Science and Technology*, 43(3), pp. 381-392, p. 381-385.
- Santos, J. M. S. (2008). "Filetes de Pregado (*Psetta maxima*) Embalados em Atmosfera Modificada: Avaliação da qualidade física, química e microbiológica". Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade na área Científica Água e Alimentos. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. pp. 170, p. 17-19.
- Soccol, M. C. H., & Oetterer, M. (2003). "Use of modified atmosphere in seafood preservation". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(4), pp. 569-580, p. 571, 572.
- Soliva-Fortuny, R. C., & Martin-Belloso, O. (2003). "New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review". *Trends in Food Science & Technology*, 14(9), pp. 341-353, p. 341.
- Sousa, A., Casal, S., Bento, A., Malheiro, R., Oliveira, M. B. P. P., & Pereira, J. A. (2011). "Chemical Characterization of "Alcaparras" Stoned Table Olives from Northeast Portugal". *Molecules*, 16(11), pp. 9025-9040.

- Sousa, A. C. (2008). "Caracterização Química e Actividade Biológica de Azeitonas Verdes Descaroçadas "alcaparras" Produzidas em Trás-os-Montes". Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança. pp. 105, p. 3-11.
- Tavares, S. C. P. (2013). "Determinação da vida útil de alimentos prontos para consumo em estabelecimento "Take-Away" - Revisão de procedimentos assentes na qualidade e segurança". Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. pp. 119, p. 34-43.
- Unal, K., & Nergiz, C. (2003). "The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives". *Grasas Y Aceites*, 54(1), pp. 71-76.
- Xing, Y. G., Li, X. H., Xu, Q. L., Jiang, Y. H., Yun, J. A., & Li, W. L. (2010). "Effects of chitosan-based coating and modified atmosphere packaging (MAP) on browning and shelf life of fresh-cut lotus root (*Nelumbo nucifera* Gaerth)". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), pp. 684-689, p. 684,685.

2. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL



The effect of different atmospheres and temperatures on chemical and microbiological characteristics of ‘Galega’ black table olives during their shelf life

Abstract

This study focuses on the characterization of commercial black table olives of the ‘Galega’ variety (from the Beira Interior region, Portugal) and is based on a microbiological and chemical analysis performed throughout a 207 days period. 78 samples were supplied by a private company, 39 of which were packed using modified atmosphere packaging (MAP) (20% CO₂ and 80% Ar) as the remaining 39 were packed in air. The samples were incubated at three different temperatures and periodically controlled (5 ± 3 °C, 22 ± 2 °C and 44 ± 0.5 °C). At every sampling time (0, 30, 75, 123 e 207 days) samples were subjected to microbiological (pathogenic bacteria, microbial indicators of contamination, moulds, yeasts, total viable counts (TVC), lactic acid bacteria (LAB) and fungi) and chemical analysis (acidity, chlorides, fat, moisture and N-Kjeldahl). Throughout the period under analysis, no microbial indicators of contamination (*Escherichia coli* and sulfite-reducing clostridia spores) or pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and coagulase-positive staphylococci) were detected. During the shelf life of the olives, the storage at 44 °C in both atmospheres effectively restricted the development of the microbial flora. At 22 °C and 5 °C, in both atmospheres, the values reported for TVC are similar to the values obtained for LAB. Because the samples that were stored in air showed a higher count of moulds and yeasts than those in MAP and TVC showed slower growth rates in samples from MAP stored at 5 °C, it is possible to say that the use of MAP is advantageous to avoid mould growth and enabling also a lower growth of yeasts and TVC at the storage temperature of 5 °C. Based on morphological characteristics, the predominant bacteria identified belong to the LAB group, in which the main genus were *Leuconostoc* spp. and *Pediococcus* spp.. The predominant fungi identified were yeasts with an approximate value of 90%, mostly from the *Candida* spp. and *Saccharomyces* spp. genus. The moulds presented a 10% of the total fungi identified, with *Penicillium* spp. and *Cryptococcus* spp. genus being the most frequent. Throughout

the storage time, the different packaging treatments had no effect on the particular chemical parameters measured, with the exception of fat and moisture contents when exposed to 44°C of storage. The study ended after 207 days (about one more month compared to the shelf life of similar products). At this point, the samples of ‘Galega’ black table olives didn’t complied the requirements of the consumer, because their aspect in visual terms, although chemical and microbiological parameters were acceptable.

Keywords: table olives; microbiological and chemical characterization; MAP; shelf life.

1. Introduction

Olive is the fruit of the cultivated olive tree (*Olea europaea* L.) and it is classified as an oval-shaped drupe composed of pericarp (epicarp or skin, mesocarp or pulp and endocarp or stone) and seed (Bianchi, 2003; Charoenprasert & Mitchell, 2012; Ghanbari *et al.*, 2012). *Olea europaea* L. products, mainly olive oil and table olives, are very important components of the Mediterranean diet and are largely consumed in the world (Ghanbari *et al.*, 2012; Malheiro *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2006).

Table olives are defined as the product prepared from the sound fruits of varieties of the cultivated olive tree (*Olea europaea* L.) that are chosen for their production of olives, whose volume, shape, flesh-to-stone ratio, fine flesh, taste, firmness and ease of detachment from the stone make them particularly suitable for processing (IOOC, 2004). The world production of table olives in the season 2012/2013 was 2.512.500 tons, and it is expected an increase to 2.595.500 tons in the 2013/2014 season (IOC, 2014). Portugal was the fourth country in Europe with highest production rate of table olives, behind Greece, Italy and Spain (the major producer), with 12.500 tons of table olives produced in season 2012/2013 (IOC, 2014). The main varieties of table olives commercialized are Spanish-style green olives, Californian-style ripe olives and Greek-style natural black olives, in which that the oleuropein, the bitter phenolic compound in olives, is removed. These olives are preserved by natural fermentation or by heat treatment, with or without the addition of preservatives and packed with or without covering liquid (Bianchi, 2003; Charoenprasert & Mitchell, 2012; Gómez *et al.*, 2006; Mantzouridou & Tsimidou, 2011; Pereira *et al.*, 2008). However, there are other traditional processing methods that are lesser known in the international market, such as the Portuguese ‘Galega’ variety. In this process, black olives

are placed in brine with an 8 % (w/v) NaCl concentration and a mixing native microbial population of lactic acid bacteria (LAB), and are naturally fermented in yeasts for a period of 7-8 months (Oliveira *et al.*, 2004).

Table olives are normally packed in glass and plastic containers, as well as in tins. However, there is a new trend to use other packaging materials (Panagou, 2004). The modified atmosphere packaging (MAP) is a preservation technique used for increasing the shelf life of products, changing the air surrounding the food, through the reduction of oxygen concentration by using a specific gas or a mixture of gases (depending on the type of product, packaging materials and storage temperature) (Phillips, 1996; Sandhya, 2010). Shelf life is defined as the period of time during which the food product will remain safe, retaining its desired sensory, chemical and microbiological characteristics, and comply with any label information regarding nutritional data (García-García *et al.*, 2008; García-García *et al.*, 2014). The shelf life of a product is set from the moment the food is prepared or manufactured and it's essentially determined by the analysis of microbial degradation and decomposition over time, in accordance to the conditions of storage and the treatment to which the product was subjected (Henriques, 2008; NZFSA, 2005).

Even though extensive research had been done about the application of MAP associated with low temperatures in extending the shelf-life of fruits and vegetables (Degirmencioglu, 2011; Jacxsens *et al.*, 2000; Phillips, 1996; Sandhya, 2010), there is a lack of published data on chemical and microbiological characterization of black table olives during storage at different atmospheres and temperatures. In 2004, Panagou (2004) studied the shelf life and the preservation methods of table olives, as well as the physicochemical and microbiological characteristics of untreated green olives of 'Conservolea' cultivar, packed in acidified brine or modified atmospheres and stored at 20 °C for 180 days. Sanchez-Gomez *et al.* (2013) published a study about the evolution of physicochemical and sensory characteristics of commercial Spanish-style green table olives of different Spanish cultivars, namely 'Gordal', 'Manzanilla' and 'Hojiblanca', and their main forms of presentation (whole, pitted or stuffed with pepper, garlic and anchovy paste) under real preservation conditions for a period of 3 years. Also focusing on a 3-year period, García-García *et al.* (2014), studied the evolution of the physicochemical and sensory characteristics of commercial ripe olives of 'Gordal', 'Manzanilla', 'Hojiblanca' and 'Cacereña' cultivars stored under real preservation conditions.

The aim of this study was to analyse the effect of two different packaging conditions (MAP and air) on the microbiological and chemical characteristics of ‘Galega’ black olives of stored either at 5 ± 3 °C, 22 ± 2 °C and 44 ± 0.5 °C for 207 days.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

The ‘Galega’ variety of black olives (*Olea europaea* L. cv. Galega) considered in our study was supplied by a private Portuguese company, after being subjected to a treatment with NaCl, in polyethylene pouches. The olives were then packed in 78 polyethylene terephthalate (PET) packages and sealed. Half of the samples (39) were packed using MAP with 20% of CO₂ and 80% of Ar and other half (39) in air packaging. In the same day, all samples were sent from the company to the laboratory in similar conditions. The sample temperature at reception was not preset and ranged between 20 °C and 25 °C, the laboratory temperature (LT). The study started the day after, called day zero. During 207 days, the samples were incubated at three different temperatures and periodically analysed according to Table 1.

Table 1 - Number of olives samples for each storage temperature along the shelf-life period.

Time (in days)	MAP				Air			
	5 ± 3 °C	22 ± 2 °C	44 ± 0.5 °C	LT ^a	5 ± 3 °C	22 ± 2 °C	44 ± 0.5 °C	LT
0				3				3
30	3	3	3		3	3	3	
75	3	3	3		3	3	3	
123	3	3	3		3	3	3	
207	3	3	3		3	3	3	

^a laboratory temperature (between 20 and 25 °C) (LT).

At the first day of the study (day 0) and at each sampling time, three samples (in MAP and air packaging) of ‘Galega’ black table olives were analysed microbiologically and chemically. The temperatures of storage were chosen as to simulate three different transportation and storage conditions methods for the product: i) conservation in cold (5 °C), e.g. in a refrigerator; ii) preservation at room temperature (22 °C); and iii) transportation and conservation at a high temperature (44 °C), e.g., in overseas travels or when it is consumed in tropical countries.

2.2. Microbiological analyzes

For the sample preparation, 10g of each type of olive was placed in 90g of Peptone solution (peptone 1g and sodium chloride 8.5g) (Oxoid, Basingtoke, United Kingdom) and homogenized for 2 min in a Stomacher (maximum speed). Decimal dilutions of the mother suspension were made in Peptone solution. Microbial population was assessed by microbiological analysis (Table 2) performed in an ISO/IEC 17025:2005 accredited laboratory.

Table 2 - Analytical methods used for the study of the microbiological quality of ‘Galega’ black table olives.

Assay	Analytical Method
Enumeration of yeasts and moulds	ISO 21527-2:2008
Enumeration of total viable counts (TVC)	ISO 4833-1:2013
Enumeration of <i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001
Enumeration of coagulase-positive staphylococci	ISO 6888-1:1999/ Amd. 1:2003
Enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004
Detection and Enumeration of the spores of sulphite-reducing anaerobes (clostridia)	NP 2262:1986
Detection for <i>Salmonella spp.</i>	ISO 6579:2002/Amd.1:2007
Enumeration of mesophilic lactic acid bacteria (LAB)	ISO 15214: 1998
Enumeration of fungi	Internal method

To study the LAB and fungi, decimal dilutions were made in the same diluent and 0.1 ml of each diluted sample were inoculated by spread plate in Man Rogosa Sharp medium (Oxoid, Basingtoke, United Kingdom) and in Malt Extract Agar (Oxoid, Basingtoke, United Kingdom) supplemented with chloramphenicol (0.05%). Petri plates were then aerobically incubated at 30 °C for 72 hr and at 25 °C for 3 to 5 days, for LAB and fungi counts, respectively.

Pure cultures obtained from single colonies were subjected to presumptive identification by morphologic observation and biochemical testing, as described in the Bergey’s Manual (Krieg, 1984; Sneath *et al.*, 1986; Williams & Sharpe, 1989). In addition, selected isolated colonies were identified using microtests API 50 CH (Biomérieux, Marcy l’Etoile, France), API 50CHB/E (Biomérieux, Marcy l’Etoile, France), API Coryne (Biomérieux, Marcy l’Etoile, France), API 20 Strep (Biomérieux, Marcy l’Etoile, France), BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID kit (BD Diagnostics Systems Europe, Sparks, Maryland, USA) and BBL Crystal Gram-Positive ID kit (BD Diagnostics Systems Europe, Sparks, Maryland, USA). API 32C identification ID (Biomérieux, Marcy l’Etoile, France)

was used for the phenotypic identification of yeast cells. Inoculation of a plate with chromogenic culture medium BBL CHRO Magar Candida (BD Diagnostics Systems Europe, Sparks, Maryland, USA) was used to assess the existence of strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. After isolation in Malt agar, filamentous fungi were identified according to their macroscopic morphology and microscopic observation of the vegetative (mycelia) and reproductive structures of the fungi took place.

2.3. Chemical analyzes

For sample preparation, part of the olives' flesh was placed in a blender, as all chemical determinations had to be accurately measured. About 5g of sample was extracted with 50 mL of recently boiled distilled H₂O with 30 minutes stirring and then the acidity determination was made according AOAC Official Method 942.15A (1995) (37.1.37) using NaOH 0.01 N (Panreac Química, Barcelona, Spain). In the case of chlorides, following the AOAC Official Method 928.06 (1995) (37.1.32) using KSCN 0.1 N (Merck, Darmstadt, Germany), 1.5g of the sample was mixed with 25mL of AgNO₃ 0.1 N (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom) and 20mL of concentrated HNO₃ (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom) and boiled for 15 minutes, then the volume was corrected to 50 mL with distilled H₂O. The level of fat was determined for about 2g of olive flesh using a Soxhlet apparatus (JP Selecta, Barcelona, Spain) according to AOAC Official Method 948.22 (1995) (40.1.05) using petroleum ether 40 – 60 °C (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom) as solvent with a minimum extraction time of 8 hours. About 3g of olive flesh dried at 100 ± 2 °C in a drying oven (Heraeus D-6554, Hanau, Germany) were used to determine the moisture levels, according to the AOAC Official Method 925.40 (1995) (40.1.04). The amount of nitrogen was determined by following an adaptation of the AOAC Official Method 950.48 (1995) (40.1.06) using 1.5g of the sample, digested with 10mL of distilled H₂O, 12.5mL of concentrated H₂SO₄ (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom) and two pellets Kjeltabs S/3.5 (Tecator, Höganäs, Sweden) with K₂SO₄ 3.5g and 3.5mg Se, each in a digestion system (Tecator Digestor 2006, Tecator, Höganäs, Sweden). After this digestion, 75 mL of distilled H₂O and NaOH 40% (m/V) were added (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom) to the distillation system (Tecator Kjeltac System 1002 Distilling Unit, Tecator, Höganäs, Sweden). The ammonia was captured by 25mL of H₃BO₃ 0.1 N (Merck, Darmstadt,

Germany) and titration was made with HCl 0.02 N (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom).

2.4. Statistical analysis

To study the effect of atmospheres and temperatures throughout the storage time of ‘Galega’ black table olives, we performed a multivariate analysis of variance (MANOVA). Therefore, analyses were executed using three independent variables (atmosphere, temperature and time) and ten dependent variables. Five of these variables were chemical parameters (acidity, chlorides, fat, moisture and nitrogen) and the other five were microbiological parameters (mould, yeasts, fungi, TVC and LAB). Following that, the Tukey’s posthoc test was performed, with significant differences having been defined for $p < 0.05$, using XLSTAT 2014.4.10 add-in (Addinsoft, Paris, France) for Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, United States of America).

3. Results and discussion

3.1. Microbiological changes

The microbiological quality of the olives used in this study was evaluated and compared with the Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market, Health Protection Agency (HPA, 2009). According to these guidelines, foods can be classified into thirteen different categories. Olives belong to category number thirteen, as they are fermented vegetables. In this category the values obtained for aerobic colony count are not applicable as quality criteria, due to the fact that olives have a natural flora that is not harmful in terms of food safety. If the predominant organisms exceed 10^6 cfu/g of yeasts or 10^8 cfu/g of LAB, the product may become unfit for consumption, unless some sort of processing aids are added. Throughout storage time, no microorganism’s indicators of contamination, such as *Escherichia coli* and Sulfite-reducing clostridia spores, were detected the samples. The same applies to the pathogens *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococci* coagulase-positive (< 10 cfu/g). Pereira *et al.* (2008) after carrying out the microbiological characterization of table olives commercialized in the Portuguese market, reached similar results regarding *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and coagulase-positive staphylococci. In the same study,

Sulfite-reducing clostridia spores, indicators of remote faecal contamination, were detected in almost all samples. Similar results, involving positive *Staphylococci* Coagulase were also reached by Mantzouridou, F. and Tsimidou, M.Z. (2011) when they analysed hot air-dried olives and by Panagou *et al.* (2002), who focused on dry salted olives. However Pereira *et al.* (2008) detected the presence of coagulase-positive staphylococci in a small number of samples in this study.

In this study, the population dynamics of moulds, yeasts, fungi, TVC, and LAB throughout the storage time, at different temperatures and in different atmospheres is presented in figure 1.

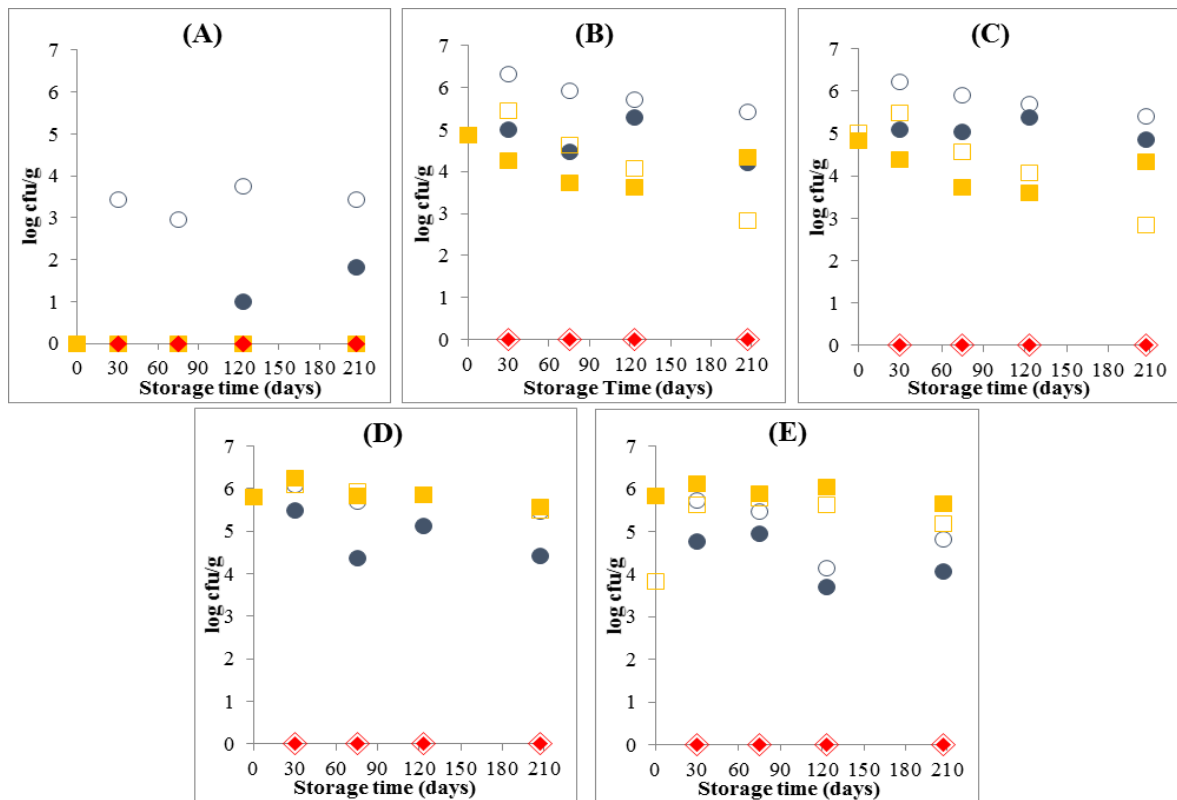


Figure 1 - Results, in log cfu/g, of moulds (A), yeasts (B), fungi (C), total viable counts (D) and lactic acid bacteria (E) at 5 °C in air (○) and in MAP (●), at 22 °C in air (□) and in MAP (■), at 44 °C in air (◇) and in MAP (◆).

The fulfilment of the HPA microbiological guidelines could be observed both for the yeast and LAB population (Figure 1(B) and (E)). However during the first thirty days of storage, the yeast population exceeded the criteria used, probably due to the fact that the

olives were still under fermentation when packed (Figure 1(B)). The storage at 44 °C in both atmospheres during the olives' shelf life effectively restricted the development of microbial flora. This temperature was used because one of the purpose of this study was to evaluate the shelf life of olives when exposed to high temperatures, considering that they are transported by sea in ship containers. At 22 °C and 5 °C, in both atmospheres, the values reported for TVC (Figure 1(D)) are similar to the values obtained for LAB (Figure 1(E)) and are not inhibited by the presence of the CO₂ in MAP, ranging from around 7 log cfu/g to 4 log cfu/g. Similar results were reported by Panagou (2004) when he found that the initial population of TVC and LAB presented slight changes and remained around 7 log cfu/g regardless for air, vacuum and MAP packaging, when a temperature of 20 °C was maintained during the shelf life.

The samples packed in air showed a higher count of mould and yeasts than in MAP (Figure 1 (A) and (B)). TVC showed slower growth rates in samples from MAP stored at 5 °C (Figure 1(D)). The use of modified atmosphere is advantageous to avoid mould growth and lower growth of yeasts at a storage temperature of 5 °C (Figure 1 (A), (B) and (D)). Panagou *et al.* (2002) also observed that the death rate of yeasts in samples stored in MAP conditions was higher than in olive samples stored under aerobic conditions (Figure 1(B)). Panagou (2006), in other study, confirmed that the combination of the atmosphere with low storage temperatures, can effectively inhibit yeast and fungal growth during long-term storage and Degirmencioglu (2011) determined that MAP would effectively control yeasts and mould growth on dry-salted olive samples stored at 5 °C.

Table 3 presents the results of MANOVA with the three independent variables (atmosphere, temperature and time) and five microbial dependent variables (mould, yeasts, fungi, TVC and LAB) mentioned earlier.

Table 3 - Results, in p values, obtained from the MANOVA to the microbiological parameters.

			Moulds	Yeasts	Fungi	TVC	LAB
Coefficient of determination (R^2)			0.538	0.931	0.935	0.993	0.921
ANOVA	Atmosphere		< 0.0001**	0.042*	0.065	0.001*	0.852
	Time		0.529	0.014*	0.009*	0.000*	0.126
	Temperature		< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
Tukey test (HSD)	Time	30 vs 75	0.537	0.529	0.470	0.040*	0.181
		75 vs 123	0.640	0.920	0.910	0.520	1.000
		123 vs 207	0.999	0.542	0.519	0.012*	0.980
		30 vs 123	0.998	0.201	0.158	0.535	0.162
		30 vs 207	0.993	0.008*	0.005*	0.000*	0.322
		75 vs 207	0.709	0.208	0.184	0.276	0.988
	Temperature	5 vs 22	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
		22 vs 44	0.857	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
		5 vs 44	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**

*indicate significant differences ($p < 0.05$)** indicate very significant differences ($p < 0.0001$)

The atmosphere had a differentiating impact on moulds ($p < 0.0001$), yeasts ($p = 0.042$) and TVC ($p = 0.001$) (Figure 1 (A), (B) and (D)). In all parameters, the temperature was a very significant differentiator ($p < 0.0001$) and the Tukey test reinforces this difference to each pair of temperatures evaluated with the exception of 22 *versus* (vs) 44 °C. The time had a differentiating impact on yeasts ($p = 0.014$), fungi ($p = 0.009$) and TVC ($p = 0.000$) growth (Figure 1 (B), (C) and (D)). In accordance to Tukey test differences were observed between extreme time sample for yeasts ($p = 0.008$) and fungi ($p = 0.005$) (Figure 1 (B) and (C)). For TVC, apart from the differences observed between days 30 vs 75 and 123 vs 207, their values slowly decreased throughout storage time, resulting in a more significant difference (Tukey test $p = 0.000$) between extreme time sample (Figure 1(D)). Statistically no differences were detected between 22 °C and 44 °C for mould ($p = 0.857$). In packages stored at 5 °C no mould growth was observed in MAP, with the exception of the last days of storage, when the anaerobic growth began (Figure 1 (A)). In the same condition, but in air packaging, the samples of olives showed a higher growth throughout the storage time. Similar results were showed by Panagou *et al.* (2002) when he concluded that no mould growth was observed in any sample stored at either 5 or 20 °C after 180 days of storage, apart from the samples stored in air (control samples) on which mycelium of *Aspergillus* spp. was detected. The counts of yeasts and TVC showed some

variability in the different atmospheres analysed (Figure 1 (B) and (D)). Similar results were reported by Mantzouridou, F. and Tsimidou, M.Z. (2011) for hot air-dried olives when observed variability of TVC and yeasts under different packaging conditions. The yeasts growth at 5 °C in MAP were in the order of the magnitude of the yeasts counts at 22 °C, both in air and MAP (Figure 1 (B)). TVC had a higher development at 22 °C than at 5 °C (Figure 1 (D)). The growth of LAB was greater than 22 °C, independently of the atmosphere, which the olives were exposed, and less at 5 °C under the same conditions (Figure 1 (E)). Fungi grew more at 5 °C than at 22 °C (Figure 1 (C)).

3.1.1. LAB and Fungi identifications in olive samples

Table 4 illustrates, for LAB and fungi (yeasts and moulds), each genus and species identified, by temperature, packaging condition and storage time.

As a result of the 78 collected samples, 116 bacterial identifications were performed. The predominant bacteria identified belonged to the LAB group (84%). The main genus of LAB isolated in olive samples were *Leuconostoc* spp. and *Pediococcus* spp. with respectively 37% and 30%. *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. have also been isolated but in lesser extent. *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. were believed to be the predominant species in the storage of the table olives in this study. Similar conclusions were obtained by Abriouel et al. (2012) when studied the characterization of LAB from naturally-fermented ‘Manzanilla Aloreña’ green table olives and by Doulgeraki et al. and Argyri et al. in 2013, when they identified two of the species - *Leuconostoc* spp. and *Lactobacillus* spp. - in fermented table olives, the same that were found in our study.

As a result, in the 78 samples collected, 215 fungi identifications were performed, with the yeast population amounting for almost 90% of the total. The main genus of yeasts isolated in olive samples were *Candida* spp. (67%) and *Saccharomyces* spp. (26%). These results are in accordance with the results obtained by some authors that studied the main yeast flora found in table olives (Arroyo-Lopez et al., 2006; Pereira et al., 2008; Pereira et al., 2015). The species *Candida boidinii* and *Candida inconspicua* were found in a lower number in our study, whereas Pereira et al. (2008) observed that *Candida boidinii* was the most frequent species found in olive pulp. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida boidinii* were the most frequent species in green seasoned olives and processed black olives,

respectively, in the study carried out by Arroyo-López et al. (2006). For Pereira et al. (2015), *Saccharomyces cerevisiae* was the most frequent, followed by *Candida tropicalis*, *Pichia membranifaciens* and *Candida boidinii* during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.).

Mould was only 10% of the total fungi identified, with the genus *Penicillium* spp. being the most frequent, with an approximate value of 58% of the total mould count, followed by *Cryptococcus* spp. that presented 23%. In the study of Mantzouridou & Tsimidou, (2011) about hot air-dried olives of *Thassos* variety, *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. were identified in modified atmospheres (vacuum and MAP) at both temperatures (5 °C and 20 °C).

Table 4 - List of microbial species and genera identified, in ‘Galega’ black table olives, by temperature (in °C (5, 22 or laboratory temperature (LT)), packaging condition (MAP or Air) and storage time (in days (30, 75, 123 and/or 207)).

LAB	<i>Enterococcus avium</i> (5+MAP+30; 22+MAP+30), <i>Lactobacillus</i> spp. (5+Air+(30, 75); 5+MAP+75; 22+Air+(75, 207); 22+MAP+(75, 123, 207); LT+Air+0), <i>Leuconostoc</i> spp. (5+Air+(30, 75, 123, 207); 5+MAP+(30, 75, 123); 22+Air+(30, 75, 123); 22+MAP+(30, 75, 123); LT+MAP+0), <i>Leuconostoc citreum</i> (22+MAP+30), <i>Leuconostoc lactis</i> (22+Air+207; 22+MAP+207), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>mesenteroides</i> (5+Air+207; LT+MAP+0), <i>Pediococcus pentosaceus</i> (5+Air+(75, 207); 5+MAP+(75, 123, 207); 22+Air+(30, 75, 123); 22+MAP+(30, 75, 123, 207)).
Yeasts	<i>Candida</i> spp. <i>n/albicans n/tropicalis</i> (5+Air+(75, 207); 5+MAP+(30, 207); 22+Air+(30, 75, 207); 22+MAP+75), <i>Candida albicans</i> (LT+Air+0) <i>Candida boidinii</i> (5+Air+(30, 75, 123); 5+MAP+(123); 22+Air+(75, 123, 207); 22+MAP+(75, 123, 207)), <i>Candida curvata</i> (5+MAP+207), <i>Candida inconspicua</i> (5+Air+(30, 123); 5+MAP+(30, 123); 22+Air+(30, 123); 22+MAP+(30, 123); LT+Air+0; LT+MAP+0), <i>Candida lambica</i> (5+Air+(30, 75, 123, 207); 5+MAP+(30, 123, 207); 22+Air+(30, 75, 123, 207); 22+MAP+(30, 75, 123); LT+Air+0; LT+MAP+0), <i>Rhodotorula</i> spp. (5+Air+(30, 75, 123, 207); LT+Air+0; LT+MAP+0), <i>Saccharomyces</i> spp. (5+Air+(30, 75, 123, 207); 5+MAP+(30, 123, 207); 22+Air+(30, 75, 123, 207); 22+MAP+(30, 75, 123, 207); LT+Air+0; LT+MAP+0).
Moulds	<i>Cladosporium</i> spp. (5+MAP+207), <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Cryptococcus albidus</i> (5+Air+75), <i>Cryptococcus laurentii</i> (22+Air+75), <i>Geotrichum</i> spp. (5+MAP+207), <i>Penicillium</i> spp. (5+Air+(30, 75, 123, 207); 5+MAP+123; 22+Air+(30, 75)).

3.2. Chemical changes

As expected, due to the influence of some factors as variety, ripening time and preparation methods the results obtained for chemical characterization of ‘Galega’ black table olives are different from other data already published. However, the study carried out by Sousa et al. (2011) about the chemical characterization of ‘Alcaparras’ table olives are

similar to the olives in this study, as they were also subjected to a traditional method used in Portugal. They only differ in classification, because the olives of the ‘Alcaparras’ variety are green and stoned table, whereas those from the ‘Galega’ variety are natural black olives.

The effect of different atmospheres and temperatures on acidity (expressed as lactic acid), chlorides, fat, moisture and N-Kjeldahl content in the olive samples throughout storage time are presented in Figure 2.

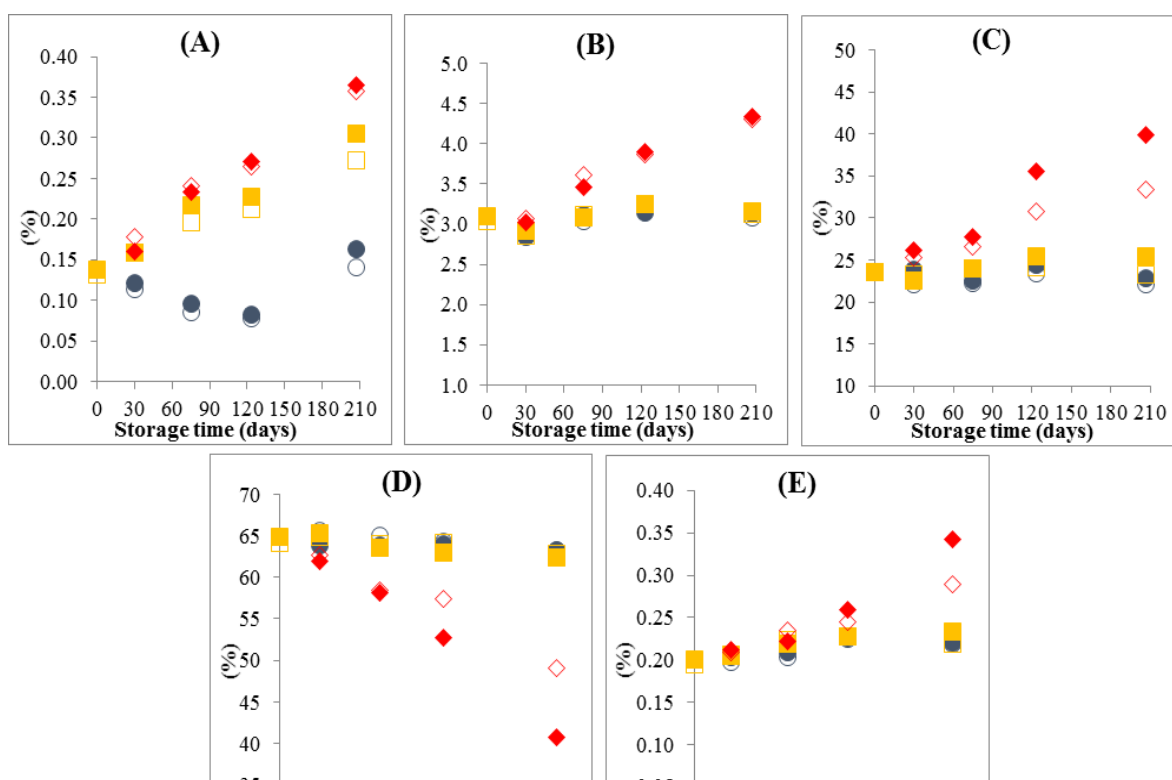


Figure 2 - Results, in (%), of acidity (expressed as lactic acid) (A), chloride (B), fat (C), moisture (D) and N-Kjeldahl (E) at 5 °C in air (○) and in MAP (●), at 22 °C in air (□) and in MAP (■), at 44 °C in air (◇) and in MAP (◆).

In the beginning of the study, time zero, the samples packed under air had the following composition: 0.13% of acidity, 3.03% of chloride, 23.5% of fat, 64.1% of moisture and 0.19% of N-Kjeldahl (Figure 2 (A) to (E) respectively). Also, at time zero days, the samples packed under MAP presented 0.14% of acidity, 3.10% of chloride, 23.5% of fat, 64.9% of moisture and 0.20% of N-Kjeldahl (Figure 2 (A) to (E) respectively). Throughout the storage time, the different packaging conditions had no effect on the specific chemical parameters measured, with the exception of fat and

moisture contents, Figure 2 (C) and (D), respectively. Similar results have been observed by Panagou *et al.* (2002) when they concluded that the different storage atmospheres had no effect on the particular physicochemical characteristics measured, but a decrease in moisture content was observed. Fat levels at 44 °C had a slight increase and after day 123, the samples in MAP showed a higher increase than the samples packed in air (Figure 2 (C)). This fat increase results from its relation to the dry matter available on product, and when exposed to higher temperatures (44 °C) the dry matter increases due to moisture decrease. Because of this relation an increase in the concentration of the others chemical parameters was also observed. The moisture, at 44 °C, suffered a more intense decrease in MAP than in air packaging (Figure 2 (D)). This observation could be explained because of the equilibrium occurring along the storage time between the gases contained in the MAP and the air in the environment. During this process, the polar compounds such as water are not allowed to go inside of the package because of the apolar PET barrier. If the water concentration inside the package of the modified atmosphere is lower than the exterior, than the olives dehydrate faster in these conditions.

If olives were stored at 5 °C and 20 °C, the analysed chemical parameters presented slight changes throughout storage time, with the exception of acidity. This component showed an increase over time, at 22 °C and 44 °C, until 0.37%. At 5 °C there was a decrease in the first 123 days of storage until 0.07%. By day 207 there was an increase of 0.16% and 0.14%, in MAP and air packaging, respectively (Figure 2 (A)). Moisture was the major component and presented values that varied from 61.6% to 66.6%, followed by fat that showed values ranging from 21.7% to 26.1% (Figure 2 (D) and (C) respectively). The chloride values were between 2.71% and 3.38%, and N-Kjeldahl varied from 0.19% to 0.35% (Figure 2 (B) and (E) respectively). These results are in line with those obtained by Sousa *et al.* (2011), who referred to water varying from 58.9% to 80%, fat ranging from 7.6% to 29.3% and the crude protein varying from 0.8% to 1.7% (result in a 0.13% to 0.27% of N-Kjeldahl).

In table 5, we find the results of MANOVA, with the three independent variables (atmosphere, temperature and time) and five dependent chemical variables (acidity, chlorides, fat, moisture and N-Kjeldahl).

Table 5 - Results, in p values, obtained from the MANOVA to the chemical parameters.

			Acidity	Chloride	Fat	Moisture	N-Kjeldahl
Coefficient of determination (R^2)			0.893	0.781	0.688	0.715	0.640
ANOVA	Atmosphere		0.211	0.838	0.013*	0.045*	0.131
	Time		< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
	Temperature		< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
Tukey test (HSD)	Time	30 vs 75	0.012*	0.000*	0.844	0.326	0.188
		75 vs 123	0.625	0.030*	0.031*	0.687	0.073*
		123 vs 207	< 0.0001**	0.554	0.585	0.003*	0.028*
		30 vs 123	0.000*	< 0.0001**	0.003*	0.032*	0.000*
		30 vs 207	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
		75 vs 207	< 0.0001**	0.001*	0.001*	< 0.0001**	< 0.0001**
	Temperature	5 vs 22	< 0.0001**	0.822	0.470	0.913	0.423
		22 vs 44	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
		5 vs 44	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**

*indicate significant differences ($p < 0.05$)** indicate very significant differences ($p < 0.0001$)

The different atmospheres only had a differentiating impact on fat ($p = 0.013$) and moisture ($p = 0.045$) (Figure 2 (C) and (D)). In all components, temperature and time were very significantly differentiators ($p < 0.0001$). In temperature, there are not significant differences between 5 and 22 °C, except for acidity, but for the other pairs of comparison (5 vs 44 °C and 22 vs 44 °C) all parameter values are significantly different ($p < 0.0001$). In moisture no differences were observed between the means of all values on the intervals for days 30 vs 75 or 75 vs 123, but there is a difference for the other time intervals that correspond to more distant dates. There was a small variation of values at 5 °C and 22 °C and a sharp decrease in the value at 44 °C throughout storage time (Figure 2 (D)). In acidity there is a slight increase over time at 22 °C and a more marked increase at 44 °C. At 5 °C of storage, the acidity values show a slight variation without a clear trend with a decrease in the first 123 days and an increase in the next 84 days (Figure 2 (A)). The chloride values show little changes through time at 5 and 22 °C but also an extensive increase at 44 °C. There are differences in the values of chloride for the intervals of time analysed except for the last two times (day 123 vs. 207) (Figure 2 (B)). The fat and N-Kjeldahl had similar behaviours with chloride, and there were only differences in their behaviour for air packaging (Figure 2 (C) and (E)). In the case of fat, the variation in air packaging was indistinct from MAP at 44 °C.

4. Conclusions

In this study we carried out a 207-day evaluation of the chemical and microbiological parameters of 'Galega' black table olives, considering two different kinds of packaging conditions and three different storage temperatures.

Regarding food safety, the 'Galega' black table olives can be described as a product with a satisfactory microbiological quality with regards to the established criteria in the HPA guideline. Throughout the storage period, the microorganisms *Escherichia coli*, Sulfite-reducing clostridia spores, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and coagulase-positive staphylococci were undetectable.

The storage of olives at 44 °C in both atmospheres during the period under evaluation effectively restricted the development of microbial flora. At 22 °C and 5 °C, in both atmospheres, the values reported for TVC are similar to the values obtained for LAB.

The use of modified atmosphere is advantageous to avoid mould growth and hinder the growth of yeast and TVC at the storage temperature of 5 °C.

Throughout the storage time, different packaging conditions had no effect on the particular chemical parameters measured, with the exception of fat and moisture contents when stored at 44 °C.

At the end of the study the samples of olives became unacceptable to consume, once their aspect in visual terms hadn't complied with the requirements of the consumer, although chemical and microbiological parameters were acceptable.

5. References

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M. A. F., Perez-Pulido, R., & Galvez, A. (2012). "Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives". *Food Microbiology*, 32(2), pp. 308-316, p. 308, 309.
- AOAC 925.40 (1995). "AOAC Official Method 925.40 Moisture in Nuts and Nut Products". Chapter 40.1.04.

- AOAC 928.06 (1995). "AOAC Official Method 928.06 Chlorine (Total) in Fruit Products". Chapter 37.1.32.
- AOAC 942.15A (1995). "AOAC Official Method 942.15 Acidity (Titratable) of Fruit Products". Chapter 37.1.37.
- AOAC 948.22 (1995). "AOAC Official Method 948.22 Fat (Crude) in Nuts and Nut Products". Chapter 40.1.05.
- AOAC 950.48 (1995). "AOAC Official Method 950.48 Protein (Crude) in Nuts and Nut Products". Chapter 40.1.06.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). "Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests". *Food Microbiology*, 33(2), pp. 282-291, p. 282, 283.
- Arroyo-Lopez, F. N., Duran-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A., & Garrido-Fernandez, A. (2006). "Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives". *Food Microbiology*, 23(8), pp. 791-796.
- Bianchi, G. (2003). "Lipids and phenols in table olives". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(5), pp. 229-242.
- Charoenprasert, S., & Mitchell, A. (2012). "Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), pp. 7081-7095, p. 7081.
- Degirmencioglu, N. (2011). "Influence of Temperature and Modified Atmosphere on the Microbial Profile of Packed Gemlik Dry-salted Olives". *Journal of Food Safety* (31), pp. 115-124.
- Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. A., Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., & Panagou, E. Z. (2013). "Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives". *Lwt-Food Science and Technology*, 50(1), pp. 353-356.

- García-García, P., Lopez-Lopez, A., & Garrido-Fernandez, A. (2008). "Study of the shelf life of ripe olives using an accelerated test approach". *Journal of Food Engineering*, 84(4), pp. 569-575, p. 569, 570.
- García-García, P., Sanchez-Gomez, A. H., & Garrido-Fernandez, A. (2014). "Changes of physicochemical and sensory characteristics of packed ripe table olives from Spanish cultivars during shelf-life". *International Journal of Food Science and Technology*, 49(3), pp. 895-903.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., & Saari, N. (2012). "Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)- A Review". *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), pp. 3291-3340. p. 3297.
- Gómez, A. H. S., García-García, P., & Navarro, L. R. (2006). "Trends in table olive production - Elaboration of table olives". *Grasas Y Aceites* (57), pp. 86-94.
- Henriques, A. R. B. C. S. (2008). "Avaliação da Vida Útil de Refeições “Cook-Chill” e “Cook-Freeze”: Indicadores Microbiológicos, Físico-Químicos e Sensoriais". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. pp. 89, p. 26.
- HPA (2009). "Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market". London: Health Protection Agency (HPA), November 2009. pp. 1-34.
- IOC (2014). "About olives". Internacional Olive Council (IOC). Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/77-about-olives>. Accessed 2014 October 13.
- IOOC (2004). "Trade Standard Applying to table olives". Internacional Olive Oil Council COI/OT/NC no. 1 Dezembro de 2004. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>. Accessed 2014 October 13.
- ISO 4833-1. (2013). "Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique".

- ISO 6579:2002/Amd.1. (2007). "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage."
- ISO 6888-1:1999/Amd. 1. (2003). "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium AMENDMENT 1: Inclusion of precision data."
- ISO 11290-2:1998/Amd.1. (2004). "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method AMENDMENT 1: Modification of the enumeration medium."
- ISO 15214 (1998). "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C".
- ISO 16649-2 (2001). "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide".
- ISO 21527-2 (2008). "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95".
- ISO/IEC 17025 (2005). "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories".
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., De Rudder, T., & Debevere, J. (2000). "Designing equilibrium modified atmosphere packages for fresh-cut vegetables subjected to changes in temperature". *Food Science and Technology*, 33(3), pp. 178-187, p. 178, 179.
- Krieg, N. R. (1984). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 1.)". Baltimore: Williams & Wilkins.

- Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). "Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives". *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), pp. 450-457, p. 450, 451.
- Mantzouridou, F., & Tsimidou, M. Z. (2011). "Microbiological quality and biophenol content of hot air-dried Thassos cv. table olives upon storage". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), pp. 786-795, p. 786, 787.
- NP 2262 (1986). "Microbiologia alimentar – Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores". Instituto Português da Qualidade.
- NZFSA (2005). "A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods" (pp. 32). PO Box 2835, Wellington, New Zealand: New Zealand Food Safety Authority (NZFSA).
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., & Peres, C. (2004). "Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety". *Grasas Y Aceites*, 55(3), pp. 219-226.
- Panagou, E. Z. (2004). "Effect of different packing treatments on the microbiological and physicochemical characteristics of untreated green olives of the Conservolea cultivar". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(8), pp. 757-764.
- Panagou, E. Z. (2006). "Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C". *Food Science and Technology*, 39(4), pp. 323-330.
- Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Katsaboxakis, K. Z. (2002). "Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20°C". *International Journal of Food Science and Technology*, 37(6), pp. 635-641.
- Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A., & Estevinho, M. L. (2008). "Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects". *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), pp. 2895-2902.
- Pereira, E. L., Ramalhosa, E., Borges, A., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2015). "YEAST dynamics during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.)". *Food Microbiology* (46), pp. 582-586, p. 582.

- Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R., & Bento, A. (2006). "Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), pp. 8425-8431, p. 8425.
- Phillips, C. A. (1996). "Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce". *International Journal of Food Science and Technology*, 31(6), pp. 463-479.
- Sanchez-Gomez, A. H., Garcia-Garcia, P., & Fernandez, A. G. (2013). "Spanish-style green table olive shelf-life". *International Journal of Food Science and Technology*, 48(8), pp. 1559-1568.
- Sandhya (2010). "Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs". *Food Science and Technology*, 43(3), pp. 381-392, p. 381-385.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Vol. 2.)". Baltimore: Wilkins & Williams.
- Sousa, A., Casal, S., Bento, A., Malheiro, R., Oliveira, M. B. P. P., & Pereira, J. A. (2011). "Chemical Characterization of "Alcaparras" Stoned Table Olives from Northeast Portugal". *Molecules*, 16(11), pp. 9025-9040.
- Williams, S. T., & Sharpe, M. E. (1989). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol.4 ed.)". Baltimore: Williams & Wilkins.

3. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS



3.1. CONCLUSÕES GERAIS

O trabalho desenvolvido nesta dissertação resultou da necessidade que uma empresa privada tinha em realizar um estudo ao tempo de vida útil do fruto que comercializavam e desejavam exportar, as azeitonas de mesa de variedade Galega. Ao longo de cerca de sete meses (207 dias) as azeitonas foram monitorizadas quanto aos seus parâmetros microbiológicos (agentes patogénicos, microrganismos indicadores de contaminação, bolores, leveduras, fungos, microrganismos a 30 °C e bactérias lácticas) e químicos (acidez, cloretos, gordura, humidade e azoto) estando armazenadas a diferentes temperaturas (5 ± 3 °C, 22 ± 2 °C e 44 ± 0.5 °C) e atmosferas (MAP com uma composição de 20% de CO₂ e 80% de Ar e atmosfera normal (ar)). O estudo teve esta duração uma vez que o prazo de validade colocado pelas indústrias alimentares, a azeitonas de mesa, com condições de embalagem semelhantes, é de seis meses (1 mês a menos que o tempo do estudo realizado).

Quando armazenadas em salmoura, a durabilidade das azeitonas de mesa é sempre muito superior, tendo em conta que se trata de um conservante, no entanto a procura de novos mercados e de novas formas de apresentação das mesmas ao consumidor, leva a que os produtores procurem novas embalagens e novas formas de acondicionamento para tornarem o produto mais atrativo.

Nos estudos mencionados por Sánchez-Gomes et al. (2013) e García-García et al. (2014), o tempo de prateleira atinge os 3 anos quando as azeitonas são acondicionadas em salmoura. O único estudo similar a este é o de Panagou (2004) e o tempo de vida nesse estudo foi de 108 dias em atmosferas modificadas (MAP, vácuo e atmosfera normal) e em salmoura. A grande diferença existente entre estes estudos passa pela necessidade ou não do produtor usar atmosfera modificada ou simplesmente embalar sem qualquer tipo de atmosfera, reduzindo a partida os custos de produção.

Os resultados obtidos revelam que 5 ± 3 °C é a melhor temperatura de armazenamento das azeitonas de mesa e que não há diferenças significativas entre os dois tipos de embalagem, durante o tempo de vida estudado, logo não se justifica o investimento por parte do produtor no acondicionamento do produto em MAP composta por 80% de Ar e 20% de CO₂.

Futuramente, tendo em conta que o estudo desenvolvido na dissertação não contabiliza o tipo de embalagem a vácuo, seria imprescindível realizar um estudo acerca do efeito de diferentes tratamentos de embalagem (MAP com uma composição maior de CO₂, vácuo e atmosfera normal) nas características microbiológicas e químicas da azeitona de mesa de variedade galega armazenada a três diferentes temperaturas (5 ± 3 °C, 22 ± 2 °C e 44 ± 0.5 °C) e a sua influência no tempo de prateleira estabelecido.

No desenvolvimento experimental foram realizadas análises aos parâmetros microbiológicos e químicos da azeitona em estudo. Em trabalhos futuros sugere-se um estudo onde se realizem análises também aos parâmetros físicos e sensoriais do fruto ao longo do armazenamento.

APÊNDICES

APÊNDICE I: RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS REALIZADAS AOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

AI.1: Regressão da variável bolores

Tabela 2 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.538
R² ajustado	0.495
MSE	0.848
REQM	0.921
MAPE	35.706
DW	1.314
Cp	7.000
AIC	-5.223
SBC	10.714
PC	0.562

Tabela 3 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	18.929	18.929	22.317	< 0,0001
Tempo	3	1.896	0.632	0.745	0.529
Temperatura	2	43.365	21.683	25.565	< 0,0001

Tabela 4 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	-0.460	0.287	-1.603	0.114	-1.034	0.113
Atmosfera-Air	1.025	0.217	4.724	< 0,0001	0.592	1.459
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	0.085	0.307	0.276	0.784	-0.528	0.698
Tempo-75	-0.329	0.307	-1.071	0.288	-0.942	0.284
Tempo-123	0.034	0.307	0.112	0.911	-0.579	0.648
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	1.712	0.266	6.440	< 0,0001	1.181	2.243
Temperatura-22	0.141	0.266	0.530	0.598	-0.390	0.672
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 5 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	1.025	4.724	1.997	< 0,0001	Sim
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 6 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
30 vs 207	0.413	1.346	2.637	0.537	Não
30 vs 123	0.085	0.276	2.637	0.993	Não
30 vs 75	0.050	0.163	2.637	0.998	Não
75 vs 207	0.363	1.183	2.637	0.640	Não
75 vs 123	0.034	0.112	2.637	0.999	Não
123 vs 207	0.329	1.071	2.637	0.709	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 7 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
5 vs 44	1.712	6.440	2.399	< 0,0001	Sim
5 vs 22	1.571	5.911	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 44	0.141	0.530	2.399	0.857	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AI.2: Regressão da variável leveduras

Tabela 8 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.931
R² ajustado	0.925
MSE	0.435
REQM	0.660
MAPE	8.861
DW	1.358
Cp	7.000
AIC	-53.257
SBC	-37.320
PC	0.084

Tabela 9 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	1.868	1.868	4.291	0.042
Tempo	3	5.012	1.671	3.838	0.014
Temperatura	2	376.163	188.082	432.128	< 0,0001

Tabela 10 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	-0.527	0.206	-2.560	0.013	-0.937	-0.116
Atmosfera-Air	0.322	0.156	2.072	0.042	0.012	0.633
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	0.733	0.220	3.333	0.001	0.294	1.172
Tempo-75	0.434	0.220	1.974	0.053	-0.005	0.873
Tempo-123	0.295	0.220	1.339	0.185	-0.145	0.734
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-4	5.405	0.190	28.380	< 0,0001	5.024	5.785
Temperatura-22	3.968	0.190	20.834	< 0,0001	3.587	4.348
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 11 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	0.322	2.072	1.997	0.042	Sim
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 12 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
30 vs 207	0.733	3.333	2.637	0.008	Sim
30 vs 123	0.438	1.994	2.637	0.201	Não
30 vs 75	0.299	1.359	2.637	0.529	Não
75 vs 207	0.434	1.974	2.637	0.208	Não
75 vs 123	0.140	0.635	2.637	0.920	Não
123 vs 207	0.295	1.339	2.637	0.542	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 13 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
5 vs 44	5.405	28.380	2.399	< 0,0001	Sim
5 vs 22	1.437	7.546	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 44	3.968	20.834	2.399	< 0,0001	Sim
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AI.3: Regressão da variável Microrganismos a 30 °C

Tabela 14 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.993
R² ajustado	0.992
MSE	0.055
REQM	0.235
MAPE	3.758
DW	1.157
Cp	7.000
AIC	-202.181
SBC	-186.244
PC	0.008

Tabela 15 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	0.645	0.645	11.729	0.001
Tempo	3	1.243	0.414	7.532	0.000
Temperatura	2	512.205	256.103	4655.550	< 0,0001

Tabela 16 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	-0.281	0.073	-3.845	0.000	-0.427	-0.135
Atmosfera-Air	0.189	0.055	3.425	0.001	0.079	0.300
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	0.355	0.078	4.539	< 0,0001	0.199	0.511
Tempo-75	0.142	0.078	1.814	0.074	-0.014	0.298
Tempo-123	0.249	0.078	3.189	0.002	0.093	0.405
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	5.456	0.068	80.577	< 0,0001	5.320	5.591
Temperatura-22	5.841	0.068	86.265	< 0,0001	5.705	5.976
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 17 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	0.189	3.425	1.997	0.001	Sim
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 18 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
30 vs 207	0.355	4.539	2.637	0.000	Sim
30 vs 75	0.213	2.724	2.637	0.040	Sim
30 vs 123	0.106	1.349	2.637	0.535	Não
123 vs 207	0.249	3.189	2.637	0.012	Sim
123 vs 75	0.107	1.375	2.637	0.520	Não
75 vs 207	0.142	1.814	2.637	0.276	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 19 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
22 vs 44	5.841	86.265	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 5	0.385	5.687	2.399	< 0,0001	Sim
5 vs 44	5.456	80.577	2.399	< 0,0001	Sim
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AI.4: Regressão da variável Bactérias Láticas

Tabela 20 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.921
R² ajustado	0.914
MSE	0.562
REQM	0.750
MAPE	9.821
DW	1.523
Cp	7.000
AIC	-34.822
SBC	-18.885
PC	0.096

Tabela 21 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	0.020	0.020	0.035	0.852
Tempo	3	3.332	1.111	1.976	0.126
Temperatura	2	423.598	211.799	376.696	< 0,0001

Tabela 22 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	-0.079	0.234	-0.340	0.735	-0.546	0.387
Atmosfera-Air	0.033	0.177	0.188	0.852	-0.320	0.386
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	0.430	0.250	1.720	0.090	-0.069	0.929
Tempo-75	-0.082	0.250	-0.328	0.744	-0.581	0.417
Tempo-123	-0.096	0.250	-0.386	0.701	-0.596	0.403
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	4.267	0.216	19.714	< 0,0001	3.835	4.700
Temperatura-22	5.714	0.216	26.397	< 0,0001	5.282	6.146
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 23 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	0.033	0.188	1.997	0.852	Não
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 24 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
30 vs 123	0.527	2.106	2.637	0.162	Não
30 vs 75	0.512	2.048	2.637	0.181	Não
30 vs 207	0.430	1.720	2.637	0.322	Não
207 vs 123	0.096	0.386	2.637	0.980	Não
207 vs 75	0.082	0.328	2.637	0.988	Não
75 vs 123	0.015	0.058	2.637	1.000	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 25 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
22 vs 44	5.714	26.397	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 5	1.447	6.683	2.399	< 0,0001	Sim
5 vs 44	4.267	19.714	2.399	< 0,0001	Sim
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AI.5: Regressão da variável Fungos

Tabela 26 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.935
R² ajustado	0.929
MSE	0.411
REQM	0.641
MAPE	8.449
DW	1.390
Cp	7.000
AIC	-57.464
SBC	-41.527
PC	0.079

Tabela 27 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	1.448	1.448	3.528	0.065
Tempo	3	5.199	1.733	4.221	0.009
Temperatura	2	377.153	188.577	459.335	< 0,0001

Tabela 28 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	-0.511	0.200	-2.557	0.013	-0.910	-0.112
Atmosfera-Air	0.284	0.151	1.878	0.065	-0.018	0.585
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	0.747	0.214	3.496	0.001	0.320	1.173
Tempo-75	0.436	0.214	2.040	0.045	0.009	0.862
Tempo-123	0.294	0.214	1.376	0.174	-0.133	0.720
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	5.411	0.185	29.254	< 0,0001	5.042	5.780
Temperatura-22	3.975	0.185	21.493	< 0,0001	3.606	4.345
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 29 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	0.284	1.878	1.997	0.065	Não
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 30 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
30 vs 207	0.747	3.496	2.637	0.005	Sim
30 vs 123	0.453	2.120	2.637	0.158	Não
30 vs 75	0.311	1.456	2.637	0.470	Não
75 vs 207	0.436	2.040	2.637	0.184	Não
75 vs 123	0.142	0.664	2.637	0.910	Não
123 vs 207	0.294	1.376	2.637	0.519	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 31 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
5 vs 44	5.411	29.254	2.399	< 0,0001	Sim
5 vs 22	1.436	7.761	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 44	3.975	21.493	2.399	< 0,0001	Sim
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AI.6: Resumo das médias em relação ao tipo de atmosfera

Tabela 32 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros microbiológicos analisados.

	Bolores	Leveduras	Microrganismos a 30 °C	Bactérias Lácticas	Fungos
Air	1.130	3.285	3.860	3.344	3.271
MAP	0.105	2.963	3.671	3.310	2.987

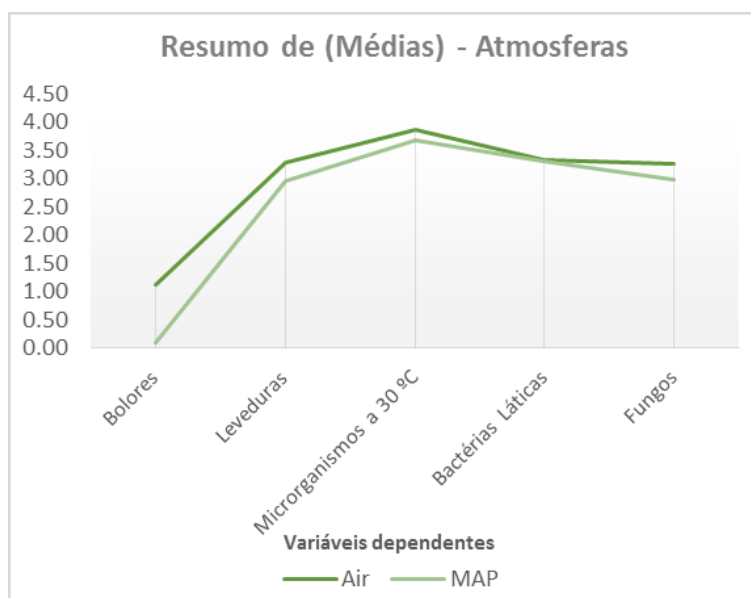


Figura 1 - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada tipo de atmosfera em relação aos parâmetros microbiológicos analisados.

AI.7: Resumo das médias em relação à temperatura de armazenamento

Tabela 33 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros microbiológicos analisados.

Temperatura	Bolores	Leveduras	Microrganismos a 30 °C	Bactérias Láticas	Fungos
5 ± 3 °C	1.712	5.405	5.409	5.456	4.267
22 ± 2 °C	0.141	3.968	3.968	5.841	5.714
44 ± 0.5 °C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

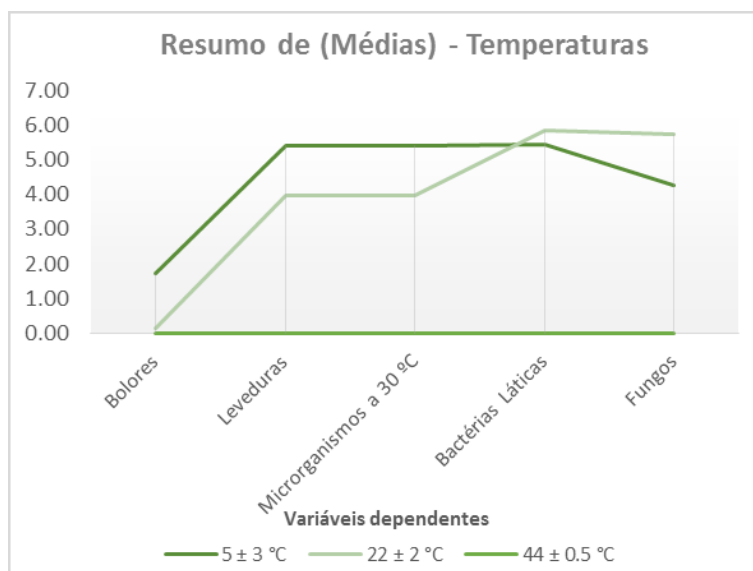


Figura 2 - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada temperatura de armazenamento em relação aos parâmetros microbiológicos analisados.

APÊNDICE II: RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS REALIZADAS AOS PARÂMETROS QUÍMICOS

AII.1: Regressão da variável Acidez

Tabela 34 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.893
R² ajustado	0.883
MSE	0.096
REQM	0.310
MAPE	13.444
DW	0.589
Cp	7.000
AIC	-162.183
SBC	-146.246
PC	0.130

Tabela 35 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	0.153	0.153	1.599	0.211
Tempo	3	17.030	5.677	59.208	< 0,0001
Temperatura	2	34.969	17.485	182.370	< 0,0001

Tabela 36 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	3.712	0.097	38.448	< 0,0001	3.519	3.905
Atmosfera-Air	-0.092	0.073	-1.265	0.211	-0.238	0.053
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	-1.316	0.103	-12.752	< 0,0001	-1.522	-1.110
Tempo-75	-0.989	0.103	-9.583	< 0,0001	-1.195	-0.783
Tempo-123	-0.865	0.103	-8.376	< 0,0001	-1.071	-0.658
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	-1.651	0.089	-18.472	< 0,0001	-1.830	-1.473
Temperatura-22	-0.450	0.089	-5.035	< 0,0001	-0.629	-0.272
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 37 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	0.092	1.265	1.997	0.211	Não
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 38 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
207 vs 30	0.413	1.346	2.637	0.537	Não
207 vs 75	0.085	0.276	2.637	0.993	Não
207 vs 123	0.050	0.163	2.637	0.998	Não
123 vs 30	0.363	1.183	2.637	0.640	Não
123 vs 75	0.034	0.112	2.637	0.999	Não
75 vs 30	0.329	1.071	2.637	0.709	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 39 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
44 vs 5	1.712	6.440	2.399	< 0,0001	Sim
44 vs 22	1.571	5.911	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 5	0.141	0.530	2.399	0.857	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AII.2: Regressão da variável Cloretos

Tabela 40 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.781
R² ajustado	0.760
MSE	0.042
REQM	0.205
MAPE	4.666
DW	0.968
Cp	7.000
AIC	-221.218
SBC	-205.282
PC	0.267

Tabela 41 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	0.002	0.002	0.042	0.838
Tempo	3	3.634	1.211	28.681	< 0,0001
Temperatura	2	6.125	3.063	72.526	< 0,0001

Tabela 42 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	3.929	0.064	61.326	< 0,0001	3.802	4.057
Atmosfera-Air	0.010	0.048	0.205	0.838	-0.087	0.107
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	-0.586	0.068	-8.558	< 0,0001	-0.723	-0.449
Tempo-75	-0.285	0.068	-4.162	< 0,0001	-0.422	-0.148
Tempo-123	-0.090	0.068	-1.320	0.191	-0.227	0.046
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	-0.636	0.059	-10.716	< 0,0001	-0.754	-0.517
Temperatura-22	-0.600	0.059	-10.119	< 0,0001	-0.719	-0.482
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 43 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	0.010	0.205	1.997	0.838	Não
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 44 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
207 vs 30	0.586	8.558	2.637	< 0,0001	Sim
207 vs 75	0.285	4.162	2.637	0.001	Sim
207 vs 123	0.090	1.320	2.637	0.554	Não
123 vs 30	0.496	7.238	2.637	< 0,0001	Sim
123 vs 75	0.195	2.842	2.637	0.030	Sim
75 vs 30	0.301	4.396	2.637	0.000	Sim
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 45 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
44 vs 5	0.636	10.716	2.399	< 0,0001	Sim
44 vs 22	0.600	10.119	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 5	0.035	0.597	2.399	0.822	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AII.3: Regressão da variável Gordura

Tabela 46 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.688
R² ajustado	0.659
MSE	5.773
REQM	2.403
MAPE	6.574
DW	0.762
Cp	7.000
AIC	132.863
SBC	148.799
PC	0.380

Tabela 47 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	37.421	37.421	6.482	0.013
Tempo	3	186.661	62.220	10.778	< 0,0001
Temperatura	2	602.150	301.075	52.154	< 0,0001

Tabela 48 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	32.589	0.749	43.501	< 0,0001	31.093	34.085
Atmosfera-Air	-1.442	0.566	-2.546	0.013	-2.573	-0.311
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	-3.942	0.801	-4.922	< 0,0001	-5.541	-2.342
Tempo-75	-3.284	0.801	-4.100	0.000	-4.883	-1.684
Tempo-123	-1.017	0.801	-1.270	0.209	-2.616	0.583
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	-6.503	0.694	-9.375	< 0,0001	-7.888	-5.117
Temperatura-22	-5.685	0.694	-8.196	< 0,0001	-7.070	-4.300
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 49 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	1.442	2.546	1.997	0.013	Sim
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 50 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
207 vs 30	3.942	4.922	2.637	< 0,0001	Sim
207 vs 75	3.284	4.100	2.637	0.001	Sim
207 vs 123	1.017	1.270	2.637	0.585	Não
123 vs 30	2.925	3.652	2.637	0.003	Sim
123 vs 75	2.267	2.831	2.637	0.031	Sim
75 vs 30	0.658	0.821	2.637	0.844	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 51 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
44 vs 5	6.503	9.375	2.399	< 0,0001	Sim
44 vs 22	5.685	8.196	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 5	0.818	1.179	2.399	0.470	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AII.4: Regressão da variável Humidade

Tabela 52 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.715
R² ajustado	0.689
MSE	10.910
REQM	3.303
MAPE	4.207
DW	0.758
Cp	7.000
AIC	178.691
SBC	194.628
PC	0.346

Tabela 53 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	45.620	45.620	4.182	0.045
Tempo	3	490.294	163.431	14.980	< 0,0001
Temperatura	2	1245.873	622.937	57.099	< 0,0001

Tabela 54 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	50.248	1.030	48.790	< 0,0001	48.191	52.304
Atmosfera-Air	1.592	0.779	2.045	0.045	0.037	3.147
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	7.121	1.101	6.468	< 0,0001	4.922	9.320
Tempo-75	5.237	1.101	4.757	< 0,0001	3.039	7.436
Tempo-123	4.019	1.101	3.650	0.001	1.820	6.218
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	9.012	0.953	9.451	< 0,0001	7.107	10.916
Temperatura-22	8.624	0.953	9.045	< 0,0001	6.720	10.528
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 55 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	1.592	2.045	1.997	0.045	Sim
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 56 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
30 vs 207	7.121	6.468	2.637	< 0,0001	Sim
30 vs 123	3.102	2.818	2.637	0.032	Sim
30 vs 75	1.884	1.711	2.637	0.326	Não
75 vs 207	5.237	4.757	2.637	< 0,0001	Sim
75 vs 123	1.219	1.107	2.637	0.687	Não
123 vs 207	4.019	3.650	2.637	0.003	Sim
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 57 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
5 vs 44	9.012	9.451	2.399	< 0,0001	Sim
5 vs 22	0.388	0.406	2.399	0.913	Não
22 vs 44	8.624	9.045	2.399	< 0,0001	Sim
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AII.5: Regressão da variável Azoto

Tabela 58 - Estatísticas da bondade de ajuste

Observações	72.000
Soma dos pesos	72.000
GL	65.000
R²	0.640
R² ajustado	0.607
MSE	0.000
REQM	0.020
MAPE	5.744
DW	0.670
Cp	7.000
AIC	-558.791
SBC	-542.854
PC	0.437

Tabela 59 - Análise da Soma de Quadrados do tipo III

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Atmosfera	1	0.001	0.001	2.340	0.131
Tempo	3	0.024	0.008	20.287	< 0,0001
Temperatura	2	0.020	0.010	26.283	< 0,0001

Tabela 60 - Parâmetros do modelo

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr > t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	0.281	0.006	45.706	< 0,0001	0.269	0.293
Atmosfera-Air	-0.007	0.005	-1.530	0.131	-0.016	0.002
Atmosfera-MAP	0.000	0.000				
Tempo-30	-0.048	0.007	-7.374	< 0,0001	-0.062	-0.035
Tempo-75	-0.035	0.007	-5.345	< 0,0001	-0.048	-0.022
Tempo-123	-0.019	0.007	-2.867	0.006	-0.032	-0.006
Tempo-207	0.000	0.000				
Temperatura-5	-0.039	0.006	-6.813	< 0,0001	-0.050	-0.027
Temperatura-22	-0.032	0.006	-5.553	< 0,0001	-0.043	-0.020
Temperatura-44	0.000	0.000				

Tabela 61 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à atmosfera

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
Air vs MAP	0.007	1.530	1.997	0.131	Não
Valor crítico d de Tukey:			2.824		

Tabela 62 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação ao tempo

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
207 vs 30	0.048	7.374	2.637	< 0,0001	Sim
207 vs 75	0.035	5.345	2.637	< 0,0001	Sim
207 vs 123	0.019	2.867	2.637	0.028	Sim
123 vs 30	0.030	4.507	2.637	0.000	Sim
123 vs 75	0.016	2.478	2.637	0.073	Não
75 vs 30	0.013	2.029	2.637	0.188	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.729		

Tabela 63 – Tukey (HSD): Análise das diferenças entre as categorias com um intervalo de confiança de 95% em relação à temperatura

Contraste	Diferença	Diferença padronizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significante
44 vs 5	0.039	6.813	2.399	< 0,0001	Sim
44 vs 22	0.032	5.553	2.399	< 0,0001	Sim
22 vs 5	0.007	1.260	2.399	0.423	Não
Valor crítico d de Tukey:			3.392		

AII.6: Resumo das médias em relação ao tipo de atmosfera

Tabela 64 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros químicos analisados.

Atmosfera	Acidez	Cloreto	Gordura	Humidade	Azoto
Air	2.219	3.277	26.466	60.221	0.232
MAP	2.127	3.287	25.024	61.813	0.225

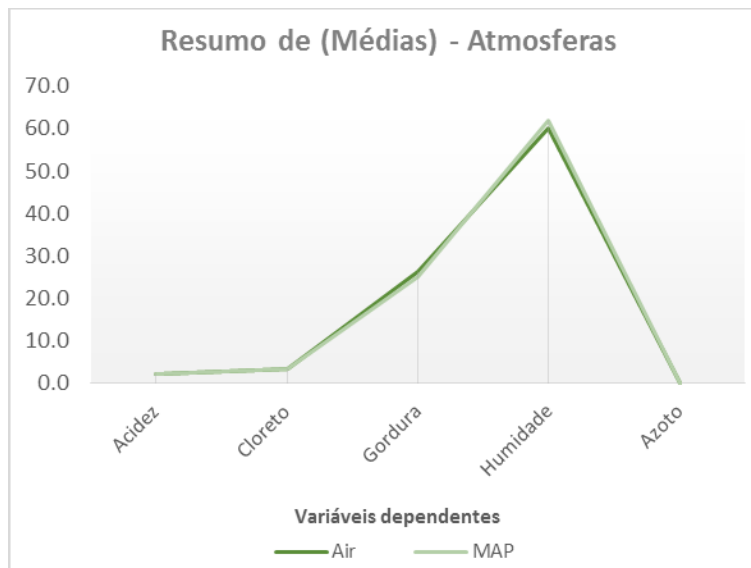


Figura 3 - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada tipo de atmosfera em relação aos parâmetros químicos analisados.

AII.7: Resumo das médias em relação à temperatura de armazenamento

Tabela 65 – Resumo das médias relacionadas com o tipo de atmosfera nos parâmetros químicos analisados.

Temperatura	Acidez	Cloretos	Gordura	Humidade	Azoto
$5 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$	2.873	3.694	29.807	55.138	0.252
$22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$	2.423	3.094	24.123	63.762	0.220
$44 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$	1.222	3.058	23.305	64.150	0.213

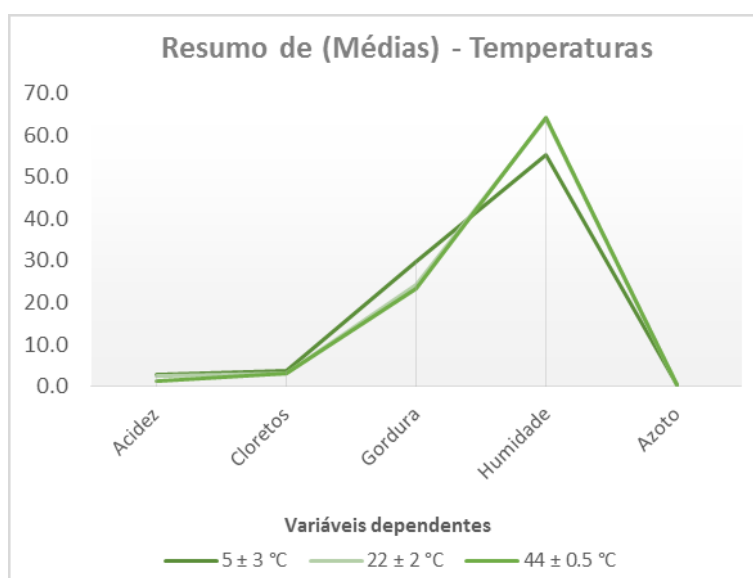


Figura 4 - Representação gráfica do resumo das médias obtidas para cada temperatura de armazenamento em relação aos parâmetros químicos analisados

